

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

SOLUBILIZAČNÍ SCHOPNOSTI POLYSACHARIDŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

RADKA LENARTOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

SOLUBILIZAČNÍ SCHOPNOSTI POLYSACHARIDŮ

SOLUBILIZATION PROPERTIES OF POLYSACCHARIDES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

RADKA LENARTOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.

BRNO 2008



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce	FCH-DIP0133/2007	Akademický rok: 2007/2008
Ústav	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka)	Lenartová Radka	
Studijní program	Spotřební chemie (M2806)	
Studijní obor	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí diplomové práce	doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti diplomové práce	Ing. Filip Mravec	

Název diplomové práce:

Solubilizační schopnosti polysacharidů

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na téma solubilizace hydrofobních solutů ve vodném prostředí.
2. Návrh experimentů studujících vliv způsobu přípravy roztoku hyaluronanu na jeho solubilizační schopnosti.
3. Provedení experimentů.
4. Vyhodnocení experimentů zejména z hlediska optimalizace přípravy roztoku tak, aby zabezpečoval požadovanou úroveň solubilizace.

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Radka Lenartová
student(ka)

doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V diplomové práci byly studovány solubilizační schopnosti polysacharidů, které byly představovány alkylovými deriváty kyseliny hyaluronové, pomocí hydrofóbních solutů (Sudan Orange G, Sudan Red G, (\pm) - α -tokoferol, pyren, perylen, Nílská červeň). Nejdříve bylo zkoumáno chování jednotlivých solutů v prostředích s různou polaritou (methanol, 1-propanol, chloroform, cyklohexan, n-heptan) a iontovou silou (voda, 0,1 M a 0,4 M NaCl). Poté byly zkoumány schopnosti modelového systému dodecylsírany sodného solubilizovat tyto hydrofóbní látky uvnitř micel. Zajímala nás solubilizační kapacita, která byla definovaná jako mol solubilizované látky na mol micel tenzidu, odpovídající stavu nasycení micel. V případě solubilizace (\pm) - α -tokoferolu v micelách SDS nebylo možné určit solubilizační kapacitu, proto jsme přešli na určování obecnější solubilizační síly, která je definovaná jako mol solubilizované látky na mol tenzid. Tato hodnota je vztažena na příslušné množství solubilizující látky při stavu nasycení micel. Modelový systém tenzidu dodecylsírany sodného byl volen proto, protože se jedná o jednoduchý tenzid nesoucí záporný náboj stejně jako alkylové deriváty hyaluronanu, který formuje unimolární micely a hodnoty kritické micelární koncentrace a agregačního čísla ve zvolených prostředích jsou tabelovány. Hlavní podstatou práce bylo stanovení vlastností hydrofóbních domén alkylových derivátů hyaluronanu jako volné místo pro začlenění hydrofóbních látek v prostředích s různou iontovou silou. Kritické agregační koncentrace byly stanoveny pomocí fluorescenční sondy pyrenu a jeho metody poměru 1:3. Pro výzkum mikropolarity domén derivátů hyaluronanu byly zvoleny dvě koncentrace derivátů. Jedna těsně nad stanovenou kritickou agregační koncentrací a druhá o něco vyšší. Byl zkoumán vliv koncentrace pyrenu na mikropolaritu domén. Zjistili jsme vliv koncentrace pyrenu. Na druhou stranu jsme našli stabilní oblast koncentrací, které mikropolaritu neovlivňují. Nakonec jsme zkoumali vliv přípravy roztoků derivátů hyaluronanu na mikropolaritu prostředí pomocí zvolené koncentrace pyrenu odpovídající stabilní oblastem. Studium solubilizačních vlastností derivátů hyaluronanu není jednoduché, jak jsme předpokládali. Při měření absorbancí prostředí o vyšších koncentracích hyaluronanu, kdy jsme předpokládali nasycení micel solubilizovanou látkou působilo rušivě, že zastiňovalo měření absorbance solubilizovaných látek. Z experimentu solubilizace s látkou Sudan Red G jsme zjistili, že nedocházelo k jeho solubilizaci v micelách derivátu hyaluronanu z efektu nízké lipofility micelárního jádra a případných sterických efektů. Proto jsme zvolili perylen jako další solubilizující látku. Při solubilizaci perylenu jsme z emisních spekter našli nasycení micel a proto jsme mohli pro danou koncentraci perylenu vyjádřit solubilizační sílu derivátů hyaluronanu. Cílem celé práce bylo stanovit optimální způsob přípravy roztoků derivátu hyaluronanu, aby zabezpečoval požadovanou úroveň solubilizace.

ABSTRACT

In this diploma thesis were studied solubilization properties of polysaccharides by using hydrophobic solutes (Sudan Orange G, Sudan Red G, (\pm) - α -Tocopherol, Pyrene, Perylene, Nile red), which were represented by alkyl derivatives of hyaluronan. At first, a behaviour of individual hydrophobic solutes was investigated in variously polar solvents (Methanol, 1-Propanol, Chloroforme, Cyklohexane, n-Heptane) and in the environment of varying ionic strength (water, 0.1 M and 0.4 M NaCl). Afterwards, solubilization properties of Sodium Dodecyl Sulfate model solubilized the hydrophobic solutes into a core of micelles was examine. We were interested in the solubilization capacity as the mol of solubilized

molecules per mol micelles of surfactant corresponding with a state of micelles saturation. In the case of the solubilization of (\pm)- α -Tocopherol into the core of micelles, it was not possible to determine the solubilization capacity. So we changed the determination of universally solubilization power. The solubilization power is defined as mol of molecules solubilized per mol surfactant relative to the quantity solubilize at the micelles saturation. Model system of Sodium Dodecyl Sulfate as a simple surfactant carrying a negative charge as the alkyl derivatives of hyaluronan was selected because of its characteristics. The surfactant forms unimolar micelles and its critical micelle concentrations and aggregation numbers are tabulated for the investigated microenvironment. The main aim of the study was investigating of hydrophobic domains of alkyl derivatives of hyaluronan as free places for incorporation hydrophobic solutes in the microenvironment of varying ionic strength. The critical aggregation concentrations were determined by the Pyrene 1:3 ratio method. For the research of micropolarity of alkyl derivatives hyaluronan's domains were selected two concentrations of derivatives for the next research of solubilization experiments - the first concentration near the critical aggregation concentration and the second concentration above it. The effect of concentration of Pyrene on a core polarity of derivatives was investigated. We discovered the influence of the concentration and the other we found a stationary area of the concentration. In the end we investigated the influence of preparation of solutions of derivatives of hyaluronan on the core polarity by the concentration of pyrene which corresponds to the stationary area. The study of solubilization properties of alkyl derivatives of hyaluronan is not a simple case as we assumed. When we measured spectra of the absorbance, higher concentration of derivatives of hyaluronan belittle absorbance of solubilizates. At the experiment of solubilization with Sudan Red G we found out that Sudan Red G is not able to solubilize into the hydrophobic core of micelles of hyaluronan's derivatives because of lipophilic or steric effects. We had to change Perylene as a new solubilize. From the measured emission spectra we found saturation micelles. We can express the solubilization power of hyaluronan's derivatives for the concentration of Perylene. The main aim of the diploma thesis was to determine optimal way of the preparation of hyaluronan's derivatives solutions with required degree of solubilization.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, hydrofóbní soluty, polymerní micely, solubilizace, solubilizační kapacita, UV-VIS spektroskopie, fluorescenční spektroskopie

KEYWORDS

hyaluronan, hydrophobic solutes, polymer micelles, solubilization, solubilization capacity, UV-VIS spectroscopy, fluorescence spectroscopy

LENARTOVÁ, R. *Solubilizační schopnosti polysacharidů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 66 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Doc. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. a konzultantovi Ing. Filipu Mravcovi za velkou trpělivost, vstřícnost a cenné rady. Dále své rodině za podporu při studiu.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Asociativní koloidy.....	9
2.1.1	Vlastnosti, struktura a dělení tenzidů.....	9
2.1.2	Vliv hydrofóbní skupiny na vlastnosti tenzidu.....	10
2.1.3	Dodecylsírán sodný (SDS)	10
2.2	Asociativní micely.....	11
2.2.1	Kritická micelární koncentrace (CMC)	11
2.2.2	Faktory ovlivňující hodnotu CMC ve vodném prostředí.....	12
2.2.3	Krafftova teplota.....	13
2.2.4	Tvar micel.....	14
2.3	Polymerní micely.....	15
2.3.1	Polymerní micely jako nosiče léčiv.....	15
2.4	Hyaluronan (HA)	16
2.5	Solubilizace.....	20
2.5.1	Mechanismus solubilizace.....	20
2.5.2	Solubilizace organických látek.....	21
2.5.3	Stupeň solubilizace.....	22
2.5.4	Faktory ovlivňující stupeň solubilizace.....	22
2.5.5	Využití solubilizace – detergence.....	23
2.6	Absorpční spektroskopie.....	24
2.6.1	Absorpce záření.....	24
2.6.2	Lambert-Beerův zákon.....	26
2.6.3	Absorpční spektrum.....	27
2.6.4	UV-VIS absorpční spektroskopie.....	27
2.6.4.1	Elektronové přechody.....	28
2.6.4.2	(±)- α - tokoferol (E^{α}).....	29
2.6.4.3	Sudan Orange G (Sudanová oranž, SOG).....	29
2.6.4.4	Sudan Red G (Sudanová červen, SRG).....	30
2.7	Fluorescenční spektroskopie.....	30
2.7.1	Luminiscence.....	30
2.7.2	Jabloňského diagram.....	31
2.7.3	Fluorofory.....	32
2.7.3.1	Nilská červen (NR).....	33
2.7.3.2	Perylen (Pe).....	33
2.7.3.3	Pyren (Py).....	33
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	36
3.1	Použité chemikálie.....	36
3.2	Použité přístroje.....	36
3.3	Princip přípravy vzorků.....	38
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
4.1	Chování použitých látek v různých prostředích.....	39
4.1.1	Charakteristika Sudan Orange G v různých prostředích.....	40
4.1.2	Charakteristika Sudan Red G v různých prostředích.....	40

4.1.3	Charakteristika (\pm)- α -tokoferolu v různých prostředích.....	41
4.1.4	Charakteristika Nílské červeně v různých prostředích.....	42
4.1.5	Charakteristika perylenu v různých prostředích.....	43
4.1.6	Charakteristika pyrenu v různých prostředích.....	44
4.2	Solubilizační schopnosti modelového systému dodecylsírany sodného (SDS).....	46
4.2.1	Solubilizace Sudan Orange G v micelárním systému SDS.....	46
4.2.2	Solubilizace Sudan Red G v micelárním systému SDS.....	48
4.2.3	Solubilizace (\pm)- α -tokoferolu v micelárním systému SDS.....	49
4.3	Solubilizační schopnosti alkylových derivátů HA (hHA).....	52
4.3.1	Určení kritické asociační koncentrace hHA pomocí pyrenu.....	52
4.3.2	Vliv koncentrace pyrenu na polaritu domén hHA.....	54
4.3.3	Vliv doby na polaritu domén hHA.....	54
4.3.4	Vliv přípravy roztoků hHA na polaritu domén.....	56
4.3.5	Vliv koncentrace Nílské červeně na polaritu domén hHA.....	56
4.3.6	Solubilizace Sudan Red G v hHA.....	58
4.3.7	Solubilizace (\pm)- α -tokoferolu v hHA.....	58
4.3.8	Solubilizace perylenu v hHA.....	58
5	ZÁVĚR.....	61
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	64
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	65
8	PŘÍLOHY.....	66

1 ÚVOD

Diplomová práce je zaměřena na studium solubilizačních schopností vodných roztoků alkylových derivátů hyaluronanu, protože se stal slibným polymerním nosičem léčiv především díky jeho afinitě k receptoru CD 44. Obecně by nosiče léčiv měly umožnit prodlouženou cirkulaci účinných látek v krevním řečišti, řízenou aktivaci a selektivní účinek zaměřený na cílovou tkáň a tím omezit nežádoucí účinky terapie, zajistit rozpustnost ve vodě nerozpustným aktivním látkám či potlačit odolnost cílové tkáně k léčivu. Existuje mnoho typů nosičů, avšak největší pozornost se zaměřuje na vývoj nosičů kancerostatik a to především z důvodů vysoké společenské závažnosti nádorových onemocnění, která je dána jejich častým výskytem, dodnes mnohdy s málo účinnou léčbou. Polymerní nosiče léčiv představují zcela nový postup při léčení zhoubných nádorů. Umožňují cíleně dopravit aktivní látku na požadované místo bez toho, aby nepříznivě ovlivnila ostatní části těla.

Fluorescenční metody se stále více používají nejen v biochemickém a biofyzikálním výzkumu, ale i v klinické chemii, genetických analýzách, monitorování prostředí a dalších oborech. Moderní metody výzkumu fluorescenční spektroskopie jsou založeny na fluorescenčních sondách. Jedná se o nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti. Volba fluorescenční sondy je klíčovou součástí experimentu, neboť právě její vlastnosti umožňují získat potřebné informace. Je známo nepřeberné množství fluorescenčních sond. Jejich výhodou je to, že se jedná o malé molekuly, které díky svým vlastnostem mohou penetrovat do nejrůznějších míst studované struktury, kde reagují na vlastnosti prostředí. Příkladem mohou být polaritní fluorescenční sondy, které reagují na změnu polarit. Toho se využívá v koloidní chemii při studiu agregátů, přesněji jejich hydrofóbních oblastí.

V úvodu teorie je krátce pojednáno o tenzidech, z důvodu použitého modelového systému představovaného dodecylsíránem sodným pro studium solubilizace. Poté je naznačena problematika polymerních micel z hlediska jejich využití jako potenciální nosiče léčiv, mezi které patří také deriváty hyaluronanu. Následuje charakteristika solubilizace a použitých technik měření. V neposlední řadě je součástí práce experimentální část na téma solubilizace polysacharidů, které představují alkylové deriváty a jejich výsledky a diskuze.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Asociativní koloidy

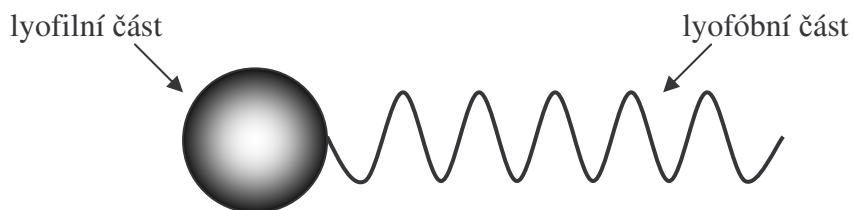
Asociativní koloidy jsou soustavy, které tvoří nízkomolekulární látky a jejich agregáty. Mezi jednoduché nízkomolekulární látky tvořící agregáty patří tenzidy. Jedná se o povrchově aktivní látky využívané v průmyslu i v teoretickém výzkumu. Patří k nejvšestrannějším produktům chemického průmyslu. Mají vlastnosti emulgační, pěnicí, smáčecí, čistící nebo stabilizační. Mohou to být detergenty (praní, umývání, čištění), léky či motorové oleje (automobily). V posledním desetiletí došlo k rozšíření jejich využití v oblastech vyspělé technologie jako je elektronický tisk, magnetický záznam, biotechnologie, mikroelektronika, výzkum virů apd. [1].

2.1.1 Vlastnosti, struktura a dělení tenzidů

Tenzidy jsou různorodé chemické látky, které mění energetické poměry na fázovém rozhraní, což se projevuje snížením povrchového napětí rozpouštědla a adsorpcí monomeru tenzidu na fázovém rozhraní. Mají asociační schopnosti. Při určité koncentraci jejich monomery asociují za vzniku větších agregátů – *micel* [2]. Tyto základní vlastnosti jsou dány jejich charakteristickou molekulární strukturou obsahující dvě části (Obr. 1). První část molekuly interaguje s rozpouštědlem velmi málo (*lyofóbní*) a druhá část molekuly hodně (*lyofilní*). Tato struktura se obecně označuje jako amfipatická nebo amfifilní.

Jestliže jsou molekuly amfipatické struktury rozpuštěné v rozpouštědle, lyofóbní skupiny mohou deformovat strukturu rozpouštědla a tím zvyšovat volnou energii systému. Dojde-li k deformaci struktury rozpouštědla, minimalizuje se kontakt mezi lyofóbní skupinou a rozpouštědlem. Pokud tenzid rozpouštíme ve vodném prostředí, lyofóbní (hydrofóbní) skupina deformuje strukturu vody přerušováním vodíkových můstků mezi molekulami vody a dochází k vyčleňování vody z okolí hydrofóbní skupiny. Výsledkem této deformace jsou hydrofóbní skupiny některých molekul tenzidu vypuzovány na rozhraní systému a tím minimalizují kontakt s molekulami vody. Povrch vody se pokrývá vrstvou molekul tenzidů, jejichž hydrofóbní skupiny jsou převážně orientovány směrem do plynné fáze. Přítomnost lyofilní (hydrofilní) skupiny zamezuje úplnému vyčlenění tenzidu z rozpouštědla a tím vzniku nové fáze. Amfipatická struktura tenzidu ovlivňuje nejen koncentraci tenzidu při povrchu a snížení povrchového napětí vody, ale také orientaci molekul při povrchu s hydrofilní částí ve vodné fázi a hydrofóbní částí orientovanou do plynné fáze [1].

Hydrofilní skupinou může být hydroxidová (-OH), karboxylová (-COOH) nebo sulfonová skupina (-OSO₃H). Hydrofóbní skupinou je nejčastěji zbytek uhlovodíkového řetězce. Méně často se jedná o halogenovaný nebo okysličený uhlovodíkový či siloxanový řetězec [2].



Obr. 1 Obecné schéma tenzidu.

V závislosti na povaze hydrofilní skupiny, její schopnosti disociovat ve vodném prostředí, jsou tenzidy klasifikovány do skupin:

1. *Anionaktivní*. Povrchově aktivní část molekuly nese negativní náboj. Příkladem může být RCOO^-Na^+ (mýdlo)
2. *Kationaktivní*. Povrchově aktivní část nese pozitivní náboj. Příkladem může být $\text{RNH}_3^+\text{Cl}^-$ (soli nebo dlouhé řetězce aminu)
3. *Amfoterní*. Povrchově aktivní část nese pozitivní i negativní náboj. Příkladem může být $\text{RN}^+\text{H}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ (dlouhý řetězec aminokyseliny)
4. *Neiontové*. Povrchově aktivní část nemá žádný náboj. Příkladem může být $\text{RCOOCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ (monoglycerid nebo dlouhý řetězec mastné kyseliny) [1]

2.1.2 Vliv hydrofóbní skupiny na vlastnosti tenzidu

S rostoucí délkou hydrofóbní skupiny dochází k:

- snížení rozpustnosti tenzidu ve vodě
- zvýšení rozpustnosti v organických rozpouštědlech
- uzavřenějšímu uspořádání molekul tenzidu na fázovém rozhraní
- nárůstu tendence tenzidu k adsorpci na rozhraní nebo z agregátů (micel)
- zvyšování teploty tání tenzidu
- větší tendence k formování fáze tekutých krystalů v roztoku
- nárůstu senzitivity tenzidu (iontového) při srážení s párovým iontem ve vodě [1].

Větvená nebo nenasycená hydrofóbní skupina má za následek:

- zvýšení rozpustnosti tenzidu ve vodě nebo v organických rozpouštědlech (ve srovnání s nevětveným řetězcem a s nasyceným izomerem)
- snížení teploty tání tenzidu a adsorbovaného filmu
- volnější uspořádání molekul tenzidu na fázovém rozhraní
- zabránění formování fáze tekutých krystalů v roztoku

nebo může:

- způsobit oxidaci a barevnou formaci nenasycených sloučenin
- snížit biodegradabilitu u sloučenin s rozvětvenou strukturou
- zvýšit tepelnou nestabilitu [1].

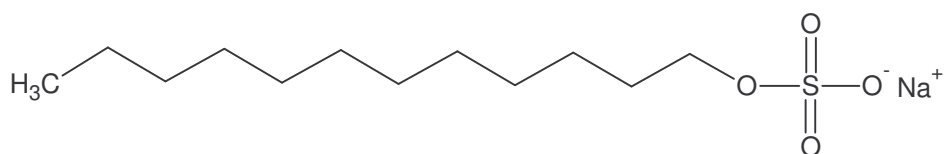
Přítomnost aromatického jádra může:

- zvýšit adsorpci tenzidu na polárním povrchu
- snížit jeho biodegradabilitu
- způsobit volnější uspořádání molekul tenzidu na fázovém rozhraní [1].

2.1.3 Dodecylsírán sodný (SDS)

Dodecylsírán sodný (Obr. 2), CAS: 151-21-3, je typickým představitelem anionaktivního tenzidu. Jeho relativní molekulová hmotnost M_r je 288,38 a teplota tání t_t je 204–207 °C [3]. Molekula SDS obsahuje dvanácti uhlíkový řetězec, na který je navázaná síranová skupina. Tato struktura dává molekule SDS amfifilní vlastnosti, které jsou pro tenzidy charakteristické. Díky jeho pěnicím schopnostem je přítomný v domácích prostředcích. Příkladem mohou být zubní pasty, šampóny, holící pěny, pěny do koupele a další. Jako všechny čisticí tenzidy, odstraňuje tuk z kůže a může způsobit podráždění kůže a očí [4].

SDS najde uplatnění nejen ve spotřebním průmyslu, ale také ve výzkumu. Jedná se o jeden z nejprobádanějších tenzidů. V tabulkách pro něj můžeme najít nejrůznější konstanty (Tab. I). Používá se jako modelový systém při studiu vlastností asociativních koloidů.



Obr. 2 Molekula SDS.

Tab. I Tabelované hodnoty agregačního čísla a CMC pro SDS při 25 °C [1].

Prostředí	Agregační číslo	CMC [mol L ⁻¹]
H ₂ O	80	8,20 · 10 ⁻³
0,1 mol L ⁻¹ NaCl	112	1,62 · 10 ⁻³
0,2 mol L ⁻¹ NaCl	118	8,30 · 10 ⁻⁴
0,4 mol L ⁻¹ NaCl	126	5,20 · 10 ⁻⁴

2.2 Asociativní micely

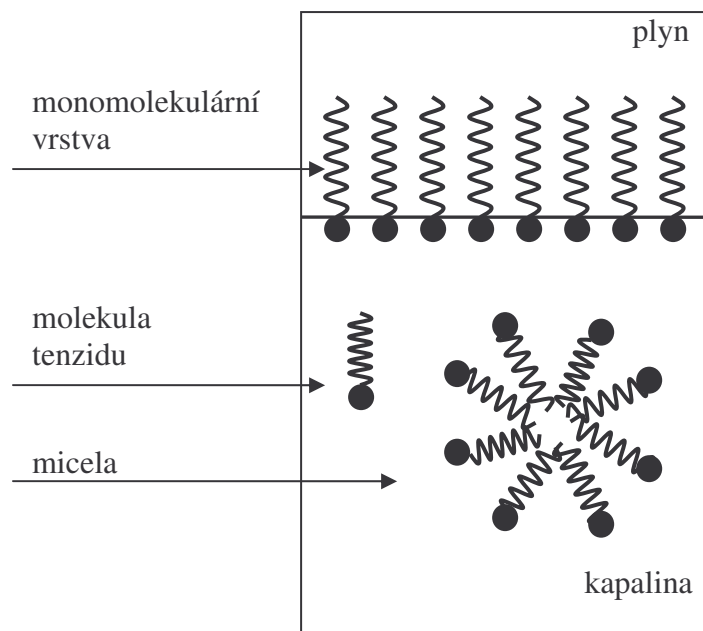
Micely jsou koloidně disperzní částice, které vznikají agregací amfifilních molekul některých nízkomolekulárních látek – tenzidů z jejich pravých roztoků po dosažení určité koncentrace zvané kritická micelární koncentrace – CMC (*Critical Micellar Concentration*). Nepotřebují stabilizaci, jejich velikost a koncentrace je určena okamžitými stavovými veličinami [5].

Formování micel je důležitý jev nejen z velkého množství povrchový jevů závislých na existenci micel v roztoku (detergence a solubilizace), ale také z důvodu ovlivňování dalších povrchových jevů, které nepřímo souvisí s micelami (snížení plošného nebo povrchové napětí). Micely se stávají předmětem velkého zájmu organické chemie a biochemie nejdříve z důvodu jejich neobvyklé katalýzy organických reakcí, později z důvodu podobnosti s biologickými membránami a globulárními proteiny [1].

2.2.1 Kritická micelární koncentrace (CMC)

Přidáváme-li tenzid do rozpouštědla, sorbuje se na fázovém rozhraní kapalina-plyn. Při určité koncentraci tenzidu, kdy je monomolekulární vrstva na fázovém rozhraní plně obsazená se začíná projevovat jeho amfifilní charakter a dochází agregaci do nadmolekulárních celků – micel, přičemž polární části molekul jsou orientované do polárního rozpouštědla a nepolární části jsou orientovány směrem dovnitř micely (Obr. 3). Tato koncentrace je pro každý tenzid jiná a nazývá se kritická micelární koncentrace – CMC.

Při CMC se v důsledku vzniku micel mění mnohé fyzikálně-chemické vlastnosti roztoků tenzidů, jako je hustota, osmotický tlak, viskozita, molární vodivost a další. Z výsledků měření takových vlastností může být stanovena nejen CMC, ale i molární hmotnost micel, jejich agregační čísla a náboj. Nejčastěji je CMC stanovována ze zlomu závislosti elektrické vodivosti, povrchového napětí a rozptylu světla. Hodnoty CMC, stanovené z koncentračních závislostí různých veličin nemusí však být úplně shodné, protože vlastnosti systému jsou tvorbou micel ovlivňovány různým způsobem [6].



Obr. 3 Schéma agregace molekul tenzidu do micel.

2.2.2 Faktory ovlivňující hodnotu CMC ve vodném prostředí

Mezi faktory ovlivňující hodnotu CMC ve vodném prostředí patří struktura tenzidu, přítomnost přidaného elektrolytu v roztoku, přítomnost různých organických látek v roztoku, teplotě a tlaku.

▪ Struktura tenzidu

Struktura tenzidu ovlivňuje hodnotu CMC jak hydrofóbní, tak hydrofilní skupinou. Obecně hodnota CMC ve vodném prostředí klesá s rostoucím hydrofóbním charakterem tenzidu.

S rostoucí délkou řetězce CMC klesá. Rozvětvení uhlovodíkového řetězce, přítomnost dvojných vazeb, polární substituce v alkylovém řetězci a přemístění iontové skupiny od konce do středu řetězce vedou ke zvýšení CMC, zatímco připojení benzenového jádra k alkylovému řetězci vede ke snížení [7]. Cis-izomery mají vyšší CMC než trans-izomery [6].

Vliv hydrofilní skupiny na CMC je dán její povahou a zejména nábojem. Při stejné délce uhlovodíkového řetězce je CMC neionogenních tenzidů nižší než ionogenních. Hodnoty CMC neionogenních tenzidů značně závisí na rozměrech a povaze hydrofilní skupiny, u ionogenních tenzidů jsou mezi různými hydrofilními skupinami malé rozdíly [7]. Tenzidy obsahující více než jednu hydrofilní skupinu vykazují vyšší CMC než tenzidy s ekvivalentní hydrofóbní skupinou avšak s jednou hydrofilní [6].

Tenzidy s objemnou hydrofóbní nebo hydrofilní skupinou mají vyšší CMC než stejné s méně objemnou skupinou. Nárůst CMC u tenzidů s objemnou hydrofóbní skupinou je pravděpodobně způsoben obtížností začlenění této hydrofóbní skupiny do nitra sférické nebo cylindrické micely [6].

Vliv protiiontů vzniklých disociací u ionogenních tenzidů na hodnotu CMC závisí především na jejich mocnostech. CMC klesá se zvyšujícím se nábojem protiiontů [7].

▪ Elektrolyt

Vliv elektrolytu na hodnotu CMC je více výrazný pro aniontové a kationtové tenzidy než amfoterní a více výrazný pro amfoterní než neiontové tenzidy [6]. Jednoduché anorganické elektrolyty snižují hodnotu CMC a to tím více, čím vyšší je koncentrace elektrolytu a čím vyšší je mocnoství opačně nabitého iontu [7].

▪ Organické látky

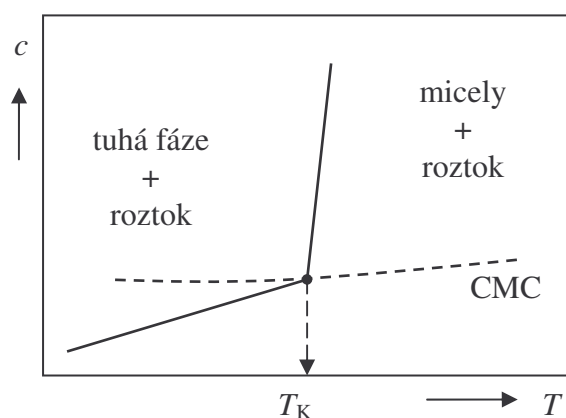
Přítomnost neelektrolytů se projevuje různě. Např. lineární alkoholy s dlouhým řetězcem snižují CMC tím více, čím vyšší je koncentrace alkoholu a délka alifatického řetězce. Nepolární látky mají na CMC většinou malý vliv [7].

▪ Teplota a tlak

S rostoucí teplotou se hodnota CMC může zvyšovat (obvykle u kationogenních micelárních koloidů) nebo snižovat (obvykle u neionogenních typů) a teplotní závislost CMC může vykazovat i zřetelné minimum. Vliv tlaku na CMC je poměrně malý i v oblastech velmi vysokých tlaků [7].

2.2.3 Krafftova teplota

Další nezbytnou podmínkou vzniku micel z aniotových či kationtových tenzidů je, aby teplota systému byla vyšší než tzv. Krafftova teplota (Krafftův bod). Na křivce závislosti pozorované rozpustnosti tenzidu na teplotě (Obr. 4) se počátek tvorby agregátů projeví zřetelným zlomem odpovídajícím Krafftově teplotě. Zatímco pod Krafftovou teplotou je rozpustnost tenzidu ve vodě nepatrná, menší než příslušná CMC, nad touto teplotou pozorovaná rozpustnost tenzidu ve vodě v důsledku tvorby agregátů výrazně vzrůstá (často i o několik řádů). Vzhledem k tomu, že se v případě aplikací tenzidů obvykle pracuje při teplotách zřetelně vyšších než je Krafftova teplota, uvádí se většinou jako nutná podmínka vzniku agregátů pouze překročení CMC. Krafftova teplota odráží rozdíly mezi energií tenzidu v krystalickém stavu a ve stavu agregátů v roztoku. Proto závisí významně na struktuře tenzidu, zejména na počtu, délce a větvení hydrofobní části, na přítomnosti dalších polárních segmentů v molekule apod. U neiontových tenzidů je analogií Krafftovy teploty tzv. bod zákalu [8].



Obr. 4 Závislost rozpustnosti tenzidů a kritické micelární koncentrace na teplotě. Kde T_K je Krafftova teplota, — je rozpustnost a --- je CMC [6].

2.2.4 Tvar micel

Tvar micel vytvořených ve vodném prostředí je důležitý k určování různých vlastností roztoků tenzidů (viskozita, solubilizační kapacita ve vodě nerozpustného materiálu, bod zákalu). Změnou teploty, koncentrace tenzidu, přísad ve vodné fázi a strukturní skupiny tenzidů dochází ke změnám velikostí, tvaru a agregačního čísla micel N_{agg} (počet molekul tenzidu tvořící micelu daného tenzidu v daném rozpouštědle) se strukturní změnou ze sférického přes tyčovitý až lamelární tvar.

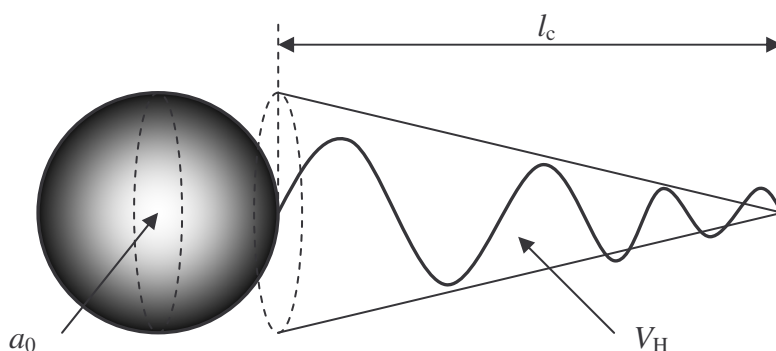
Typ vznikajícího agregátu závisí na vzájemném poměru velikosti a tvaru hydrofobní a hydrofilní části molekuly tenzidu, který se kvantitativně vyjadřuje pomocí bezrozměrné veličiny nazvané kritický "pakovací" parametr *CPP* (*Critical Packing Parametr*) (Obr. 5), který je dán rovnicí:

$$CPP = \frac{V_H}{l_c \cdot a_0}, \quad (1)$$

kde V_H je objem obsazený hydrofóbními skupinami v jádru micely, l_c je efektivní délka hydrofóbní skupiny v jádru micely a a_0 je plocha průřezu hydrofilní části na fázovém rozhraní micela – rozpouštědlo (Obr. 5) [1].

Tab. II Hodnoty *CPP* a odpovídající struktury micel [1].

<i>CPP</i>	Struktura micely
$0 - \frac{1}{3}$	kulovitá ve vodném prostředí
$\frac{1}{3} - \frac{1}{2}$	cylindrická ve vodném prostředí
$\frac{1}{2} - 1$	lamelární ve vodném prostředí
>1	inverzní (obrácená) micela v nepolárním prostředí



Obr. 5 Schéma molekuly tenzidu s veličinami popisujícími *CPP*.

2.3 Polymerní micely

Polymerní micely jsou zvláštní skupinou micel. Formují se z kopolymerů, které obsahují jak hydrofilní tak hydrofóbní monomerní jednotky (Obr. 6). Amfifilní dvoj-blokové (AB-typ) a troj-blokové (ABA-typ) kopolymery s dlouhým hydrofilním blokem převyšující hydrofóbní bloky mohou ve vodných roztocích formovat sférické micely. Tyto polymerní micely jsou složeny z jádra hydrofóbních bloků stabilizovaných korónou hydrofilních polymerních řetězců. Jestliže je hydrofilní blok dlouhý a současně objemný, kopolymer, který je tvořen tímto hydrofilním blokem, ve vodě existuje jako unimer, zatímco kopolymery s dlouhými hydrofóbními bloky formují struktury nemicelární morfologie (tyčovitě, lamelární struktury). Kromě blokových kopolymerů mohou polymerní micely formovat tzv. „Graft“ kopolymery, které vznikají rubeváním hydrofilních a hydrofóbních bloků. Základ tvoří hlavní řetězec, který je obvykle lineární, na který jsou navázány boční větve ze strukturně odlišných řetězců [9]. Příkladem „Graft“ kopolymerů mohou být deriváty kyseliny hyaluronové.

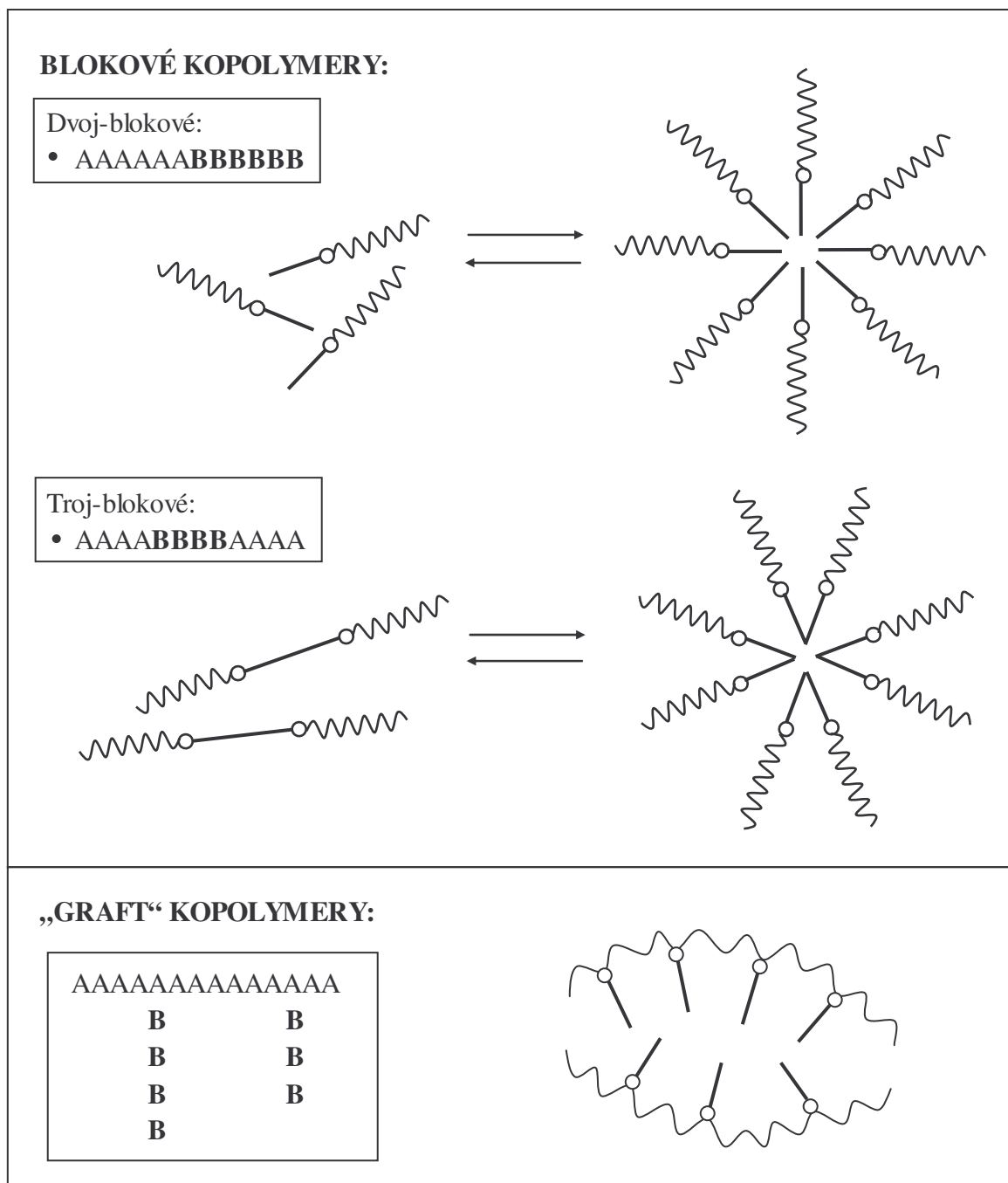
Hlavní hnací síla micelizace je pokles volné energie systému, díky přemístění hydrofóbních částí z vodného prostředí při formaci micelárního jádra stabilizovaného hydrofilními bloky směřujícími do vody. Stabilita polymerních micel významně závisí na van der Waalových interakcích mezi hydrofóbními a hydrofilními bloky. Polymerní micely jsou obvykle více stabilní ve srovnání s micelami tvořenými konvenčními tenzidy [9].

Z farmakologického hlediska jsou nejzajímavější ty polymerní micely, které jsou formovány dvoj-blokovými a troj-blokovými kopolymery. Příkladem dvoj-blokových kopolymerů může být Poly(ethylene oxid)-*b*-poly(styrene) a Poly(ethylene oxid)-*b*-poly(D, L-lactide), troj-blokových kopolymerů Poly(ethylene oxid)-*b*-poly(propylene oxid)-*b*-poly(ethylene oxid). Hydrofilní bloky těchto kopolymerů často obsahují polyethylenglykolové řetězce – PEG, protože polymer PEG je vysoce hydratovaný a může se použít jako účinný prostorový protektor různých částic (micely, liposomy, nanočástice a nanokapsle) v biologických prostředích. Troj-blokové kopolymery tvořené hydrofilními ethylenoxidovými jednotkami s hydrofóbními propylenovými jednotkami (polymery známé jako *pluronic*s) jsou nejznámější příklady farmaceutických troj-blokových kopolymerů [9]. Polymerní micely založené na hyaluronanu, které patří do skupiny „Graft“ kopolymerů, v posledních dvou letech zaznamenávají nárůst. Tyto polymerní micely jsou tvořeny amfifilními deriváty hyaluronanu.

2.3.1 Polymerní micely jako nosiče léčiv

Polymerní micely mohou sloužit jako nosiče léčiv, přičemž poskytují řadu výhod. V první řadě efektivně solubilizují ve vodě nerozpustné léčiva, zvyšují jejich biologickou dostupnost a chrání začleněná léčiva před dezaktivací biologickým prostředím. V druhé řadě mohou setrvávat v oběhu dostatečně dlouhou dobu, která poskytuje akumulaci a dále mohou sloužit pro cílený transport připojováním specifických ligandů na jejich povrch [9].

„Ideální“ farmaceutická micela by měla mít vhodnou velikost (10–100 nm), vykazovat dostatečně vysokou stabilitu *in vitro* a *in vivo*, mít nízkou hodnotu CMC a vysokou hodnotu kinetické stability, měla by být schopna dlouhého oběhu v těle a rozpadu na bioinertní popřípadě netoxické unimery, které by se snadno dostaly z těla, a měla by nést dostatečné množství začleněného léčiva. Jádro polymerní micely, která slouží jako nosič léčiva, by mělo mít velkou kapacitu pro léčivo, profil kontrolovaného uvolňování začleněného léčiva a dobrou kompaktibilitu se začleněným léčivem. Na druhou stranu koróna micely by měla poskytovat její efektivní ochranu [9].

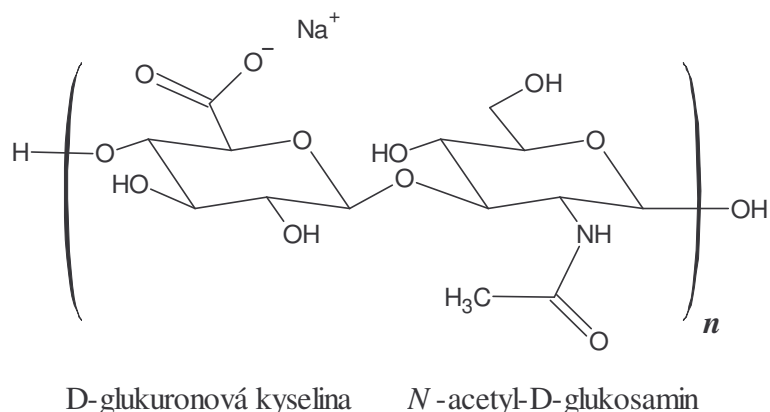


Obr. 6 Schéma kopolymerů tvořící polymerní micely. Struktura micel vzniklých formací blokových kopolymerů, kde A, $\backslash\backslash\backslash$ je hydrofilní a B, — je hydrofóbní monomerní jednotka [9].

2.4 Hyaluronan (HA)

Hyaluronan neboli sodná sůl kyseliny hyaluronové je obecný název pro lineární vysokomolekulární polysacharid nacházející se v extracelulární matrix, který byl poprvé izolovaný v roce 1934 Karlem Meyerem ze sklivce hovězího oka. Hyaluronan se vyskytuje ve vázané formě častěji než ve volné. Jeho řetězec je tvořen v závislosti na molekulové váze odpovídajícím počtem disacharidových zbytků, které obsahují D-glukuronovou kyselinu

a *N*-acetyl-D-glukosamin. Tyto sacharidy jsou navzájem propojeny přes opakující se β -1,3 a β -1,4 glykosidickou vazbu (Obr. 7).



Obr. 7 Struktura hyaluronanu. Disacharidová jednotka tvořena *D*-glukuronovou kyselinou a *N*-acetyl-D-glukosaminem propojenými β -1,3 glykosidickou vazbou.

▪ Struktura HA

Každá monomerní jednotka hyaluronanu obsahuje axiální nepolární část tvořenou atomy vodíku a ekvatoriální polární část tvořenou hydroxylovými a karboxylovými skupinami. Z důvodu propojení jednotlivých monomerních jednotek střídajícími se β -1,3 a β -1,4 glykosidickými vazbami, jednotlivé monomery představují invertní hydrofóbní a hydrofilní charakter vůči následujícímu monomeru v řetězci. Výsledkem tohoto uspořádání je vznik primární stočené struktury podobající se stuze [10]. Struktura hlavního řetězce hyaluronanu ve fyziologickém roztoku je dána kombinací chemické struktury disacharidu, vnitřními vodíkovými vazbami a interakcí s rozpouštědlem. V důsledku toho se hyaluronan v roztoku formuje do náhodně roztažené struktury, která tvoří domény (sekundární struktura). Hyaluronan v roztoku také agreguje sám se sebou a tím formuje síť (terciální struktura). K této agregaci dochází zvláště při nízkých koncentracích (1 g L^{-1}) [11].

▪ Výskyt HA

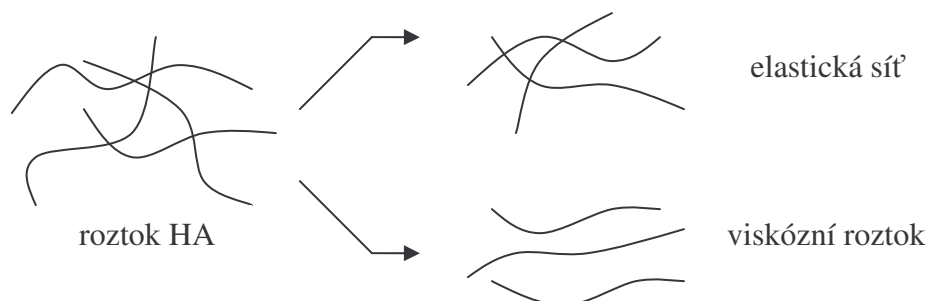
Hyaluronan se vyskytuje v živočišných tkáních. Ve vysokých koncentracích je přítomen v synoviální tekutině, sklivci oka, pojivových tkáních kohoutího hřebínku, pupeční šňůře a kůži. Je komerčně dostupný. Izoluje se extrakcí z intracelulární matrix živočišných pojivových tkání a purifikací z bakteriálních organismů. Mikroorganismy schopné produkce hyaluronanu jsou *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus zooepidemicus* a podobně [12].

▪ Vlastnosti a funkce HA

Hlavní role hyaluronanu je konstrukční, ale jeho funkce se liší v závislosti na umístění v těle. Je silně hydrofilní. Z toho vyplývá jedna z jeho nejdůležitějších vlastností, kterou je vysoká afinita k vodě. Je schopen vázat vodu v objemu až 100 % svojí váhy. Z tohoto důvodu má dokonalé hydratační účinky (kůže). Normalizuje migraci buněk, která je důležitá při hojení ran. Jeho mechanické vlastnosti jsou mazání, tlumení a absorpce otřesů (klouby). Zprostředkovává transport esenciálních živin z krevního řečiště do buněk kůže. Z farmakologického hlediska se může využívat při buněčné signalizaci díky jeho hlavnímu

receptoru CD44. Zpevňuje buněčné struktury a udržuje je v rosolovitém stavu. Tím brání pronikání cizorodých a patogenních látek do organismu.

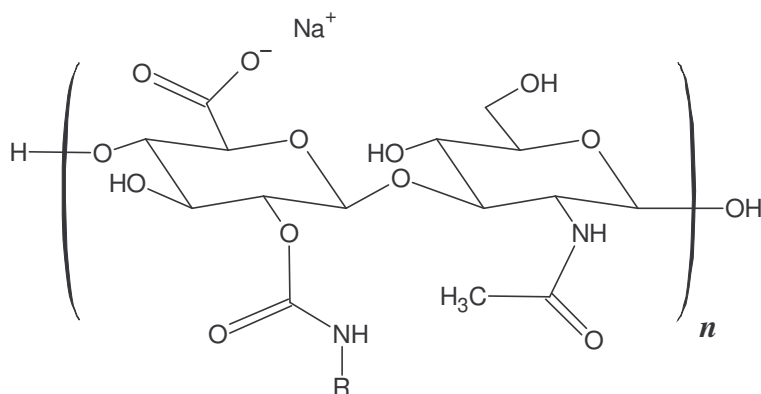
Vodný roztok hyaluronanu je viskoelastický (Obr. 8). Obsahuje dvě složky (viskozitní a elastická složka). Viskozitní složka charakterizuje kapalinu a prezentuje mazací vlastnosti. Elastická složka charakterizuje pevnou látku a prezentuje otřesové absorpční vlastnosti.



Obr. 8 Viskoelasticita HA.

▪ Alkylové deriváty HA

Alkylové deriváty HA jsou obecně estery hyaluronanu, které mají redukovanou rozpustnost ve vodě, která má za následek zvýšení jejich hydrofobicity. Příkladem těchto derivátů mohou být deriváty s alkylovým řetězcem navázaným na pozici hydroxylu (Obr. 9), které mohou být připravovány reakcí HA s vybraným alkylaminem po aktivaci hydroxylové skupiny kyanobromidem [13]. Deriváty stejného alkylového řetězce se od sebe mohou lišit molekulovou váhou vyjadřovanou v kDa (kg mol^{-1}), ale především stupněm substituce, který vyjadřuje počet alkylových jednotek na dimer HA.

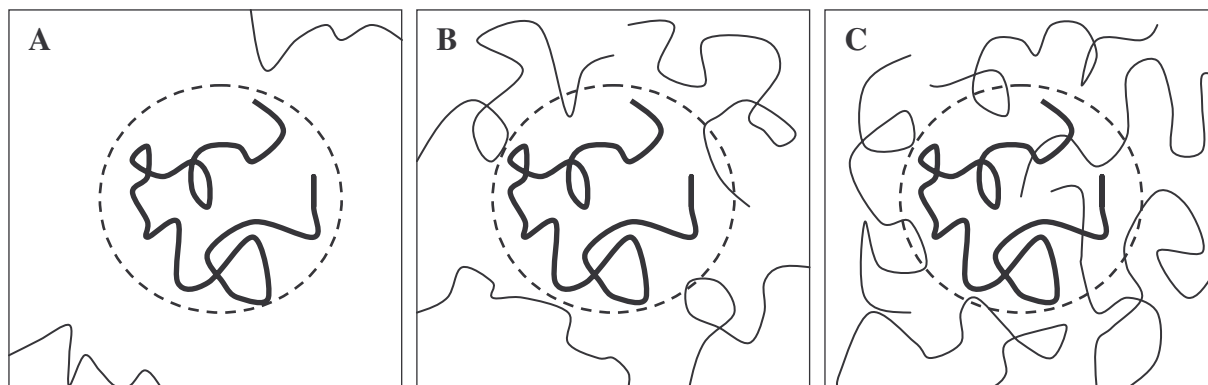


Obr. 9 Vzorec alkylového esteru.

▪ Roztok derivátů HA

Roztok polymeru (derivátu HA), není jednoduchý systém. Vlivem tepelného pohybu dochází k neustálé migraci a deformaci řetězců v roztoku a tím dochází k lokální změně koncentrace, avšak koncentrace polymeru v roztoku zůstává konstantní. Při různé koncentraci může docházet k různému ovlivňování jednotlivých řetězců polymeru v roztoku. Rozlišujeme roztok zředěný, roztok při počínajícím překryvu a koncentrovaný roztok.

Zředěný roztok (Obr. 10) je takový roztok, v němž jsou jednotlivá makromolekulární klubka od sebe oddělena spojitou fází rozpouštědla. Občas se klubka setkají. Domény klubek se střídají s oblastmi nulové koncentrace polymeru, takže zředěný roztok je koncentračně nestejnorodý. Zvyšujeme-li koncentraci, přestává zředěný roztok vyhovovat své definici při takovém složení, kdy domény klubek právě vyplní celý prostor roztoku a začínají se navzájem překrývat (Obr. 10). Zvyšujeme-li i nadále koncentraci, získáme koncentrovaný roztok (Obr. 10), kdy dochází k mnohonásobnému překryvu domén. Takový roztok představuje na první pohled stejnorodou soustavu navzájem propletených řetězců, promíšenou molekulami rozpouštědla [14].

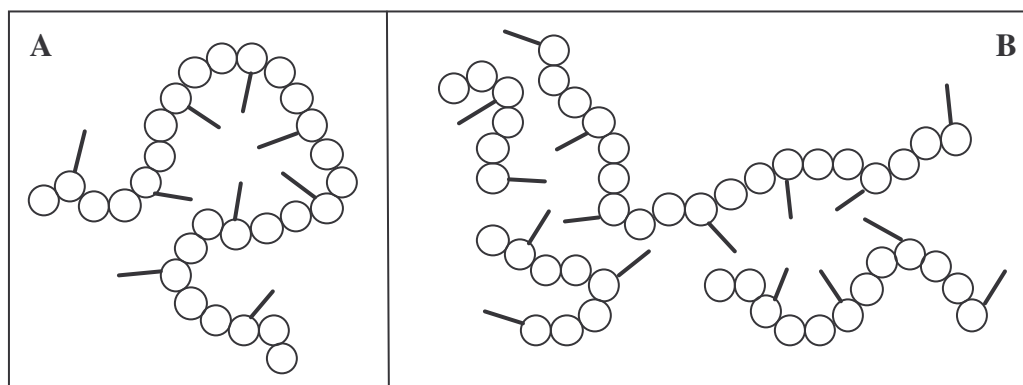


Obr. 10 Roztok polymeru. A: zředěný roztok, B: koncentrace počínajícího překryvu, C: koncentrovaný roztok. Čárkovaně je vyznačená hranice domény klubka jednoho řetězce polymeru. Mezery mezi řetězci jsou vyplněny molekulami rozpouštědla [14].

▪ Kritická asociační koncentrace (CAC)

Existuje zde jakási obdoba s tenzidy a jejich CMC. U derivátů HA nemůžeme mluvit o klasické CMC, ale o *kritické asociační koncentraci* (CAC), jelikož nedochází k formování micel s hydrofóbním jádrem, nýbrž k formování hydrofóbních domén tvořených agregací jednoho řetězce nebo kombinací více řetězců HA (Obr. 11).

Formování hydrofóbních domén je nekonečným tématem výzkumu asociujících amfifilních. Hlavní metoda, která se používá při studiu agregačních jevů v roztocích amfifilních látek je fluorescenční spektroskopie [15].

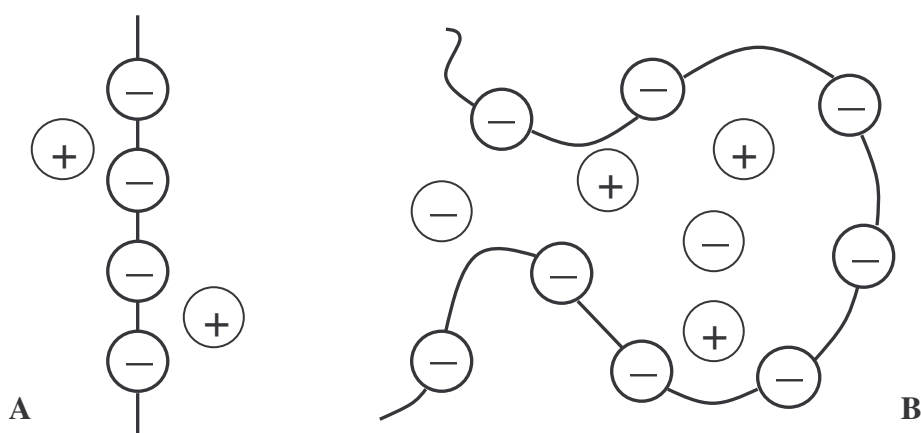


Obr. 11 Představa o intra a inter molekulární agregaci HA a vznik hydrofóbních domén v systému. A: agregace jednoho řetězce. B: agregace více řetězců.

▪ Deriváty HA jako polyelektrolyty

Neionizované ohebné lineární makromolekuly zaujímají v roztoku tvar klubka, jehož rozměry závisí jednak na délce řetězce, jednak na interakcích krátkého a dlouhého dosahu. U lineárních polyelektrolytů k tomu přistupuje velmi výrazný vliv elektrostatických interakcí, jejichž se zúčastňují náboje ionizovaných skupin řetězce a náboje malých iontů přítomných v doméně a v okolí makroiontu. Ve vodě disociuje určitý podíl ionizovatelných skupin, které se stanou nositeli elektrického náboje [14].

Hyaluronan je polymer schopný elektrolytické disociace. Disociací vzniká lineární makroion o velkém počtu elementárních záporných nábojů a ekvivalentní počet protiiontů. Malé ionty (tj. protiionty vzniklé disociací a ionty přidaných solí) vytvářejí v elektrickém poli nabitého řetězce iontovou atmosféru, která zeslabuje odpuzivý účinek nábojů řetězce a zkracuje jeho dosah tím více, čím je koncentrace malých iontů vyšší. Změna iontové síly vyvolá výrazné změny konformací makroiontu (Obr. 12) [14].



Obr. 12 Konformace makroiontu v prostředí zředěného roztoku. A: v nepřítomnosti soli, B: v přítomnosti soli [14].

2.5 Solubilizace

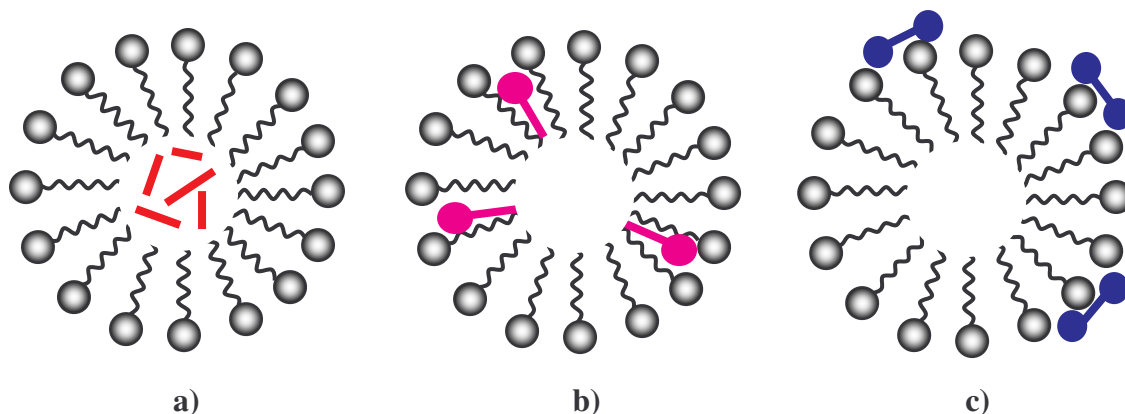
Charakteristickou vlastností asociativních koloidů, která přímo souvisí s tvorbou micel, je solubilizace. Solubilizace může být definovaná jako spontánní rozpouštění látky (pevná látka, kapalina nebo plyn) reverzibilní interakcí s micelami tenzidů v rozpouštědle za vzniku termodynamicky stabilního izotropního roztoku se sníženou termodynamickou aktivitou solubilizované látky [1]. Podstatou solubilizace je umožnění rozpouštění látek v rozpouštědlech, ve kterých by za normálních okolností rozpustné nebyly.

Solubilizace ve vodném prostředí má praktický význam v oblastech, kdy dochází k vytváření produktů, které obsahují ve vodě nerozpustné složky. Příkladem těchto oblastí může být detergence, micelární katalýza organických reakcí, emulzní polymerace, separace látek pro výrobu nebo analytické účely a zvětšení olejového výtěžku. Solubilizace v nevodném prostředí má praktický význam v suchém čištění [1].

2.5.1 Mechanismus solubilizace

Mechanismus solubilizace může být různý (Obr. 13). Lokalizace solubilizované látky v micle závisí na tom, zda je látka hydrofóbní či hydrofilní. Nepolární látky se rozpouštějí

v jádru micely, polárně-nepolární organické látky (alkoholy, aminy) se rozmisťují v micelách tak, že jejich uhlovodíkové řetězce směřují dovnitř micel a polární skupiny do vodné fáze. Solubilizace polárních látek probíhá na povrchu micely nebo těsně v blízkosti povrchu [6].



Obr. 13 Mechanismus solubilizace. Schéma rozpouštění a) nepolární, b) polárně-nepolární a c) polární látky v micelárním systému.

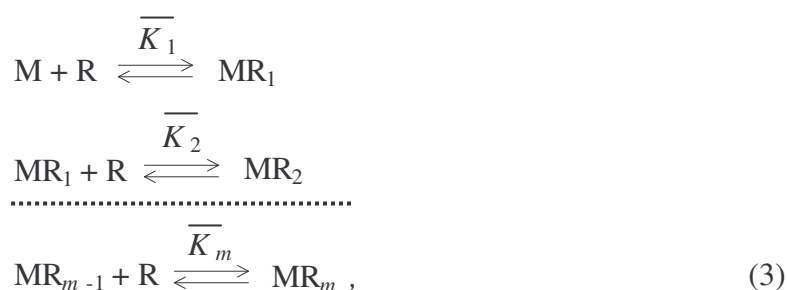
2.5.2 Solubilizace organických látek

Než dojde k solubilizaci látek, musí dojít nejprve k agregaci tenzidů do micelárních útvarů. V našem případě popisu považujeme micelární agregační číslo N_{agg} , které udává počet molekul tenzidu tvořící danou micelu, za konstantní, abychom se vyhnuli složitým matematickým vyjádřením vyplývajícím z polydisperzity systému. Z konstantního agregačního čísla vyplývá, že micely jsou monodisperzní. Rovnováha formace micel mezi monomerním tenzidem (S) a micelami (M) může být vyjádřena:



kde $K_{N_{agg}}$ je rovnovážná konstanta tvorby micel.

Jestliže je koncentrace solubilizované látky několikrát menší, než koncentrace micel, začlenění látky do micel nevykazuje žádné změny v vnitřních vlastnostech původních micel. Rovnováha asociace mezi micelou a solubilizovanou látkou (R) je vyjádřena:



kde MR_i je asociovaná micela s i solubilizovanou látkou, \overline{K}_i je asociační konstanta pro krok mezi MR_{i-1} a solubilizovaným monomerním, m je maximální počet solubilizovaných látek na micelu [16].

Průměrný počet solubilizovaných látek na micelu \bar{R} můžeme vypočítat dle vzorce:

$$\bar{R} = \frac{[R_t] - [R]}{[M_t]} = \bar{K}_1 \cdot [R], \quad (4)$$

kde $[R_t]$ je celková rovnovážná koncentrace solubilizované látky, $[R]$ je koncentrace solubilizované látky, která není začleněná v micely, $[M_t]$ je celková koncentrace micel a \bar{K}_1 je asociační konstanta prvního kroku asociace [16].

Změna standardní Gibbsovy energie solubilizace je vyjádřena:

$$\Delta G^0 = -RT \ln \bar{K}_1, \quad (5)$$

kde R je plynová konstanta ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T [K] je teplota a \bar{K}_1 je asociační konstanta prvního kroku asociace [16]. Jelikož Gibbsova energie je stavová veličina charakterizující stav rovnováhy, její změna udává samovolnost daného děje. V případě solubilizace má změna standardní Gibbsovy energie zápornou hodnotu z čeho vyplývá samovolnost toho to děje.

2.5.3 Stupeň solubilizace

Stupeň solubilizace je charakterizován solubilizační kapacitou S_c (mikroskopická veličina) a solubilizační silou S_p (makroskopická veličina) micel, které jsou definované jako počet molu solubilizátu na mol micel tenzidu. Jsou určeny poměrem $(S_w - S_{CMC})/(C_{surf} - CMC)$, kde S_w je molární rozpustnost solubilizátu ve vodném prostředí, S_{CMC} je jeho molární rozpustnost při CMC a C_{surf} je molární koncentrace tenzidu [1]. V jiné publikaci můžeme najít vyjádření solubilizační síly jako počet solubilizovaných molekul na počet molekul tenzidu tvořící micely a solubilizační kapacity jako průměrný počet solubilizovaných molekul v jedné micely při nasycení [17]. Obecně platí, že solubilizační kapacita u polárních solubilizátů je větší než u nepolárních, zvláště u sférických micel, protože mají větší dostupnou kapacitu při povrchu než uvnitř. Faktory napomáhající micelizaci (např. přidavek elektrolytů k iontovým tenzidům) zvyšují solubilizační kapacitu [1].

Množství látky, které může být solubilizováno v jedné micely, závisí na podílu části micely, kde solubilizace probíhá a obsah tohoto podílu závisí na tvaru micely. Tvar micel určuje hodnota parametru CPP , který je popsán v části 2.2 Asociativní micely. Jestliže hodnota CPP roste, micely se ve vodném prostředí stávají více asymetrické. Ve výsledku objem vnitřního jádra relativně roste s jeho hodnotou. Proto můžeme předpokládat, že solubilizace materiálu v jádře bude relativně růst s vnější částí [1].

2.5.4 Faktory ovlivňující stupeň solubilizace

Solubilizace hraje významnou roli při odstranění mastné špíny detergenty a při penetraci léčiv, kosmetických přípravků a insekticidů, proto je důležité objasnit faktory určující množství solubilizátu, které může být micelami solubilizováno. Avšak situace je komplikovaná z důvodu existence různé lokalizace solubilizace a různých typů solubilizovaných materiálů.

▪ **Struktura solubilizované látky**

Krystalické pevné látky mají obecně nižší solubilitu v micelách než kapalné látky podobné struktury. U alifatických a alkylarylových uhlovodíků rozsah solubilizace klesá s rostoucí délkou řetězce a roste s nenasycením nebo cyklizací, jestliže dochází k formování pouze jednoho kruhu. U kondenzovaných aromatických uhlovodíků rozsah solubilizace klesá s rostoucí molekulární velikostí. U polárních látek je situace komplikovaná z důvodu proměnné hloubky penetrace do micely [1].

▪ **Efekt elektrolytu**

Přídavek neutrálního elektrolytu do roztoku iontového tenzidu vykazuje nárůst rozsahu solubilizace uhlovodíků (nepolárních látek), které jsou solubilizovány uvnitř jádra a pokles u polárních látek, které jsou solubilizovány na vnější straně micel. Je to způsobeno tím, že neutrální elektrolyt v roztoku iontového tenzidu snižuje repulzi mezi nabitou hydrofilní skupinou iontového tenzidu, tím snižuje CMC, avšak agregační číslo a objem micel roste. Nárůst agregačního čísla micely má za následek nárůst solubilizace uhlovodíků. Pokles vzájemných repulzí iontových hydrofilních částí micel způsobuje jejich kompaktnější uspořádání. Tím snižuje objem micely, kde je možná solubilizace polárních látek [1].

Přídavek neutrálního elektrolytu do roztoku neiontového tenzidu zvyšuje rozsah solubilizace uhlovodíků při dané teplotě tím, že zvyšuje hodnotu agregačního čísla micely. Nárůst solubilizace po přidavku elektrolytu se objevuje stejně jako pokles bodu zákalu v pořadí elektrolytů: $K^+ > Na^+ > Li^+$; $Al^{3+} > SO_4^{2-} > Cl^-$. Efekt přidavku elektrolytu na solubilizaci polárních látek není zatím zřejmý [1].

Při vyšetřování vlivu elektrolytů na solubilizační kapacitu pyrenu v micelách SDS, který představuje skupinu iontových tenzidů, byl potvrzen vliv rostoucí iontové síly na nárůst agregačního čísla micely a pokles CMC (Kim et al., 2000). V této studii sledovali vliv párového iontu na hodnotu CMC, agregačního čísla a solubilizační kapacity. Zjistili, že CMC SDS roste v pořadí $NH_4^+ < Na^+ < Li^+$ přidávaného typu párového iontu, agregační číslo a solubilizační kapacita klesají ve stejném pořadí. Dále zkoumali závislost vlivu přidávaného elektrolytu LiCl do systému tenzidu (obsahující různé ionty) s pyrenem na změnu absorbance. Jako tenzidy použili SDS a LDS (dodecylsírán lithný). Zjistili, že nedochází k žádné změně absorbance [17].

▪ **Efekt délky alkylového řetězce**

Ve studii solubilizace pyrenu v micelách heptaethylenoxidu monoalkyl etheru C_nE_7 ($n = 10, 12, 14$ a 16), který představuje skupinu neiontových tenzidů, byla zkoumána solubilizace pyrenu v závislosti na délce alkylového řetězce za použití fluorescenční spektroskopie. Bylo zjištěno, že s rostoucí délkou alkylového řetězce roste hydrofóbnost jádra micely, což signalizuje přítomnost většího množství pyrenu v micelě. Hydrofóbnost micely rostla lineárně s rostoucím poloměrem micely [18].

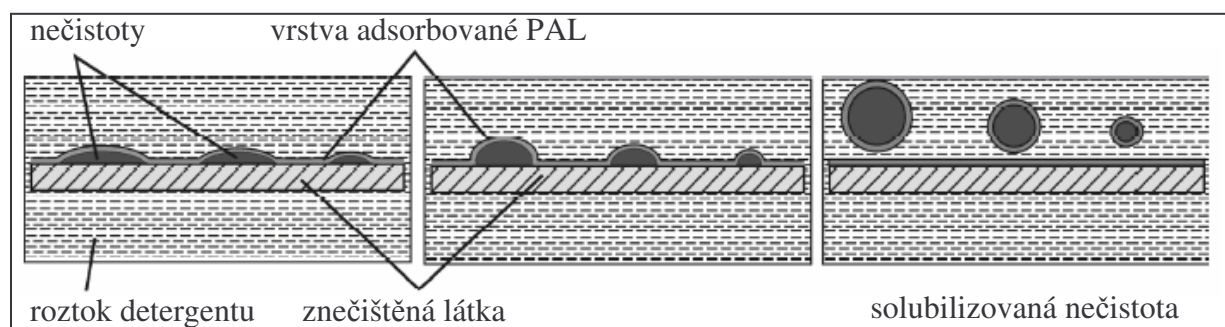
2.5.5 Využití solubilizace – detergence

Solubilizace má velký praktický význam. Orientování a koncentrování molekul solubilizací v micelách může vést k podstatné změně kinetiky chemické interakce solubilizovaných molekul mezi sebou i jejich interakcí s látkami rozpuštěnými v disperzním prostředí. Toho se využívá při micelární katalýze. Solubilizace má důležitou úlohu také při emulzní polymeraci nenasycených uhlovodíků při syntéze latexů, ve farmaceutickém

a kosmetickém průmyslu, při výrobě herbicidů, insekticidů, fungicidů atd. V systémech s nepolárním prostředím, kde vznikají obrácené micely s hydrofilním jádrem a hydrofóbním povrchem, dochází k tzv. obrácené solubilizaci. Toto koloidní rozpouštění vody v oleji v přítomnosti tenzidů se významně uplatňuje v potravinářském průmyslu [6].

V praktickém životě se většinou setkáváme s detergentem jako nejčastějším projevem solubilizace. Detergence (Obr. 14) je odstraňování nečistot z pevných povrchů působením tenzidů. Jejich molekuly se adsorbují na povrchu pevné látky a na vrstvě nečistot, čímž se mění velikost úhlu smáčení. Nečistoty se postupně sbalují a uvolňují z povrchu. Při přechodu do roztoku dochází ke stabilizaci uvolněných částic nečistot jejich solubilizací do micel, které mají hydrofilní povrch a nemohou se připoutat zpět k čistému povrchu pevné látky [19].

Při detergentu se používají detergenty. Jedná se o prací a čistící prostředky, jejichž složení je uzpůsobeno tak, aby se dosáhlo co nejvyššího čistícího účinku. Obsahují povrchově aktivní látku (tenzid) a doplňující přísady, které zlepšují působení aktivní složky. Vhodný detergent tedy musí být schopen difundovat do čištěné hmoty (např. textilních vláken), dobře smáčet její povrch, převést nečistoty do objemové fáze a solubilizovat je [20].



Obr. 14 Schéma detergentu.

2.6 Absorpční spektroskopie

Metody absorpční spektroskopie patří mezi nejstarší a dosud nejpoužívanější metody analytické chemie. Absorpce záření molekulou je základní podmínkou každého fotofyzikálního nebo fotochemického experimentu.

2.6.1 Absorpce záření

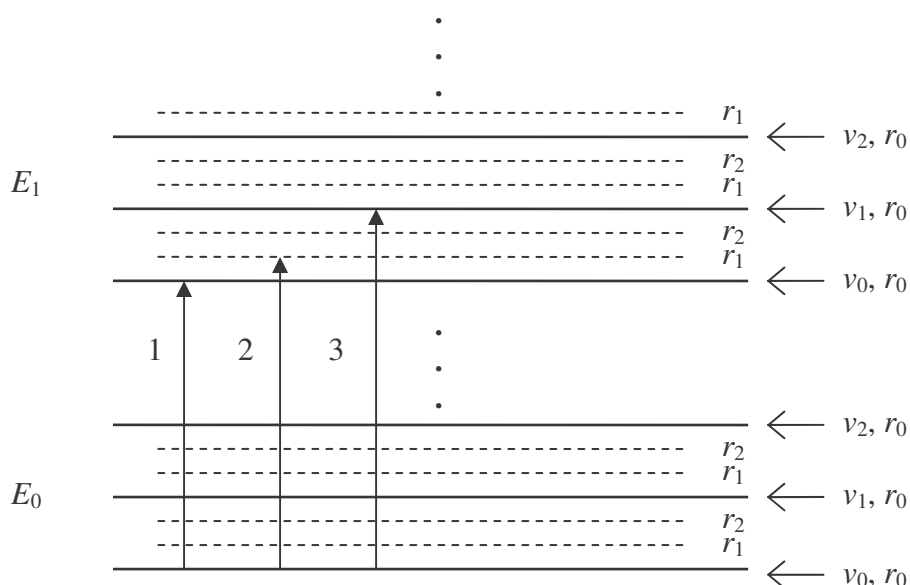
Při absorpci elektromagnetického (světelného) záření nastává interakce elektrické složky světla s elektrickým polem molekuly, které je vytvářeno pohybujícími se elektrony kolem jednotlivých jader atomů. Elektrony se pohybují v orbitalech, jejichž energie jsou kvantovány. Jestliže elektrony zaujímají nejnižší energetické stavy, říkáme, že jsou v základním stavu. Podmínkou absorpce světelného záření je existence dalších energetických kvantových stavů molekuly, kterým říkáme excitované stavy. Jinak řečeno, absorbuje-li molekula světelné záření, zaujmou elektrony vyšší energetické hladiny (orbitaly) a dostanou se do excitovaného stavu a molekula tak změní svůj elektronový stav.

Celková energie molekuly zahrnuje elektronovou, vibrační a rotační složku. Energetické rozdíly mezi jednotlivými elektronovými hladinami (základní a excitované) jsou mnohem větší než rozdíly mezi vibračními a rotačními stavy. Na obrázku (Obr. 15) je schématicky znázorněn základní a první excitovaný elektronový stav spolu s odpovídajícími vibračními

a rotačními stavy. Zároveň jsou ukázány možné energetické změny kvantových stavů po absorpci světelného záření v ultrafialové až viditelné oblasti [20].

Obecně lze říci, že některé přechody jsou více pravděpodobné, některé méně pravděpodobné. Je-li pravděpodobnost přechodu menší než 0,01, potom takovým přechodům říkáme přechody zakázané. Pravděpodobnost přechodu určuje zároveň velikost absorpce. Veličinu, která charakterizuje pravděpodobnost přechodu nazýváme molární absorpční koeficient ε . Je to veličina charakterizující strukturu sloučeniny a je nezávislá na koncentraci látky. Závisí však na průřezu absorbující částice [20].

Absorbuje-li prostředí záření ve viditelné části spektra, je toto prostředí barevné a jeho zabarvení je komplementární k barvě pohlceného záření (Tab. III).



Obr. 15 Znáznornění elektronových, vibračních a rotačních energetických stavů molekuly.

E_0, E_1 – energie základního a excitovaného elektronového stavu

v_0, v_1, v_2 – energie vibračních stavů jednotlivých elektronových stavů

r_0, r_1, r_2 – energie rotačních stavů jednotlivých vibračních stavů

1, 2, 3 – energetické přechody po absorpci světelného záření v ultrafialové a viditelné oblasti

Tab. III Vztah mezi absorbovanou a komplementární barvou [20].

λ [nm]	Barva	
	Absorbovaná	Komplementární
400–450	fialová	žlutozelená
450–480	modrá	žlutá
480–490	zelenomodrá	oranžová
490–500	modrozelená	červená
500–560	zelená	purpurová
560–580	žlutozelená	fialová
580–600	žlutá	modrá
600–650	oranžová	zelenomodrá
650–750	červená	modrozelená

2.6.2 Lambert-Beerův zákon

Prochází-li světelný paprsek prostředím, které je schopno absorbovat, je intenzita vstupujícího paprsku do prostředí vyšší než intenzita prošlého paprsku. Poprvé na tento jev poukázal Bouguer v roce 1729, kdy objevil, že část světla absorbovaného materiálem je přímo úměrná jeho tloušťce. Později, v roce 1760, byl tento jev znovuobjeven a zformulován známějším vědcem J. H. Lambertem. V roce 1852 J. Beer zformulovaný zákon absorpce rozšířil o závislost absorbovaného světelného záření na koncentraci rozpuštěné látky, která záření absorbuje [21].

Necháme-li prostředím procházet elektromagnetické záření, pozorujeme při určitých vlnových délkách absorpci záření. Vlnová délka záření do prostředí vstupujícího a z něj vystupujícího se nemění. Mění se jeho intenzita. Při průchodu paprsku prostředím má propuštěný paprsek menší intenzitu než dopadající paprsek. Pokles intenzity je dán vztahem:

$$I(\lambda) = I_0(\lambda)10^{-a(\lambda)l}, \quad (6)$$

kde $I(\lambda)$ je intenzita paprsku po průchodu absorbujícím prostředím, $I_0(\lambda)$ je intenzita vstupujícího paprsku, $a(\lambda)$ je absorpční koeficient a l je tloušťka absorbujícího prostředí.

Při průchodu záření prostředím je absorpční koeficient $a(\lambda)$ úměrný koncentraci c absorbující látky v daném prostředí:

$$a(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot c, \quad (7)$$

kde $\varepsilon(\lambda)$ je molární absorpční koeficient, který má v SI jednotkách rozměr $[\text{mol}^{-1} \text{ m}^2]$, avšak častěji používané jednotky jsou $[\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$.

Vzájemný vztah mezi velikostí absorpce, koncentrací absorbujícího prostředí a jeho tloušťkou vyjadřuje veličina nazývaná absorbance, kterou popisuje Lambert-Beerův zákon:

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} = \varepsilon(\lambda)cl, \quad (8)$$

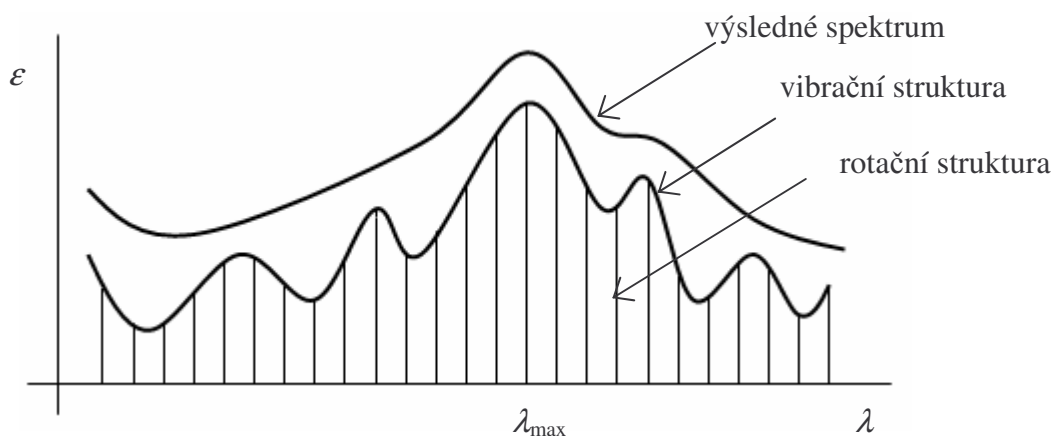
Lambert-Beerův zákon je zákonem limitním, neboť platí pouze v omezeném rozsahu, který vymezují následující podmínky:

- Záření musí být monochromatické.
- Roztok musí být velmi zředěný ($c < 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$).
- Absorbující prostředí nesmí podléhat žádným změnám.
- V roztoku musí být jen jedna absorbující složka. Jeli přítomno více složek, je absorbance součtem jednotlivých absorbancí [22].

Výhodou Lambert-Beerova zákona pro praktickou aplikaci je to, že linearizuje vztah mezi veličinou charakterizující absorpci světla – absorbancí a koncentrací. Směrnici přímky je součin molárního absorpčního koeficientu a tloušťky měřeného prostředí.

2.6.3 Absorpční spektrum

Závislost molárního absorpčního koeficientu ε , resp. absorbance na vlnové délce použitého záření nazýváme absorpční spektrum. Z obrázku (Obr. 15) vyplývá, že všechny energetické přechody jsou kvantovány. Vzhledem k množství energetických přechodů bude mít absorpční spektrum tvar širokého absorpčního pásu (Obr. 16), přičemž vlnová délka maxima absorbance (nebo maximálního molárního koeficientu) bude odpovídat nejpravděpodobnějšímu energetickému přechodu.



Obr. 16 Schématické znázornění tvorby elektronového absorpčního pásu [20].

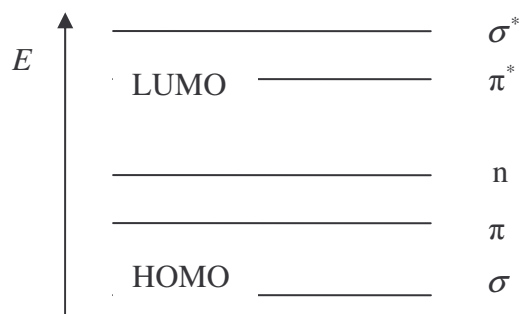
2.6.4 UV-VIS absorpční spektroskopie

Podstatou UV-VIS absorpční spektroskopie je absorpce ultrafialového a viditelného záření (200–800 nm) zředěnými roztoky molekul. Po absorpci dochází k elektronovým přechodům v molekule sledované látky. Experimentálním projevem těchto přechodů je elektronové absorpční spektrum, tj. závislost $\varepsilon = f(\lambda)$ nebo $A = f(\lambda)$. Absorpční pásy mohou patřit k šesti typům elektronových přechodů:

1. $\pi - \pi^*$	4. $n - \sigma^*$
2. $n - \pi^*$	5. přenosu náboje
3. $\sigma - \sigma^*$	6. přenosy ligandovém poli

Typy elektronů vyskytující se v organických látkách jsou σ elektrony vytvářející jednoduché vazby, π elektrony vytvářející násobné vazby a n elektrony jsou nevazebné elektrony, které jsou v molekule organické látky přítomny vždy, obsahuje-li látka heteroatomy, např. O, N, S, halogeny apod. Na obrázku (Obr. 17) jsou schématicky znázorněny energetické hladiny jednotlivých typů elektronů v základním a excitovaném (antivazebném) stavu.

Funkční skupiny, které jsou odpovědné za absorpci záření v ultrafialové a viditelné oblasti, se nazývají chromofory. Obecně lze říci, že skupiny obsahující π elektrony jsou chromofory pro ultrafialovou a viditelnou oblast a skupiny obsahující pouze σ elektrony jsou chromofory pro dalekou ultrafialovou oblast [20].



Obr. 17 Schématické znázornění energetických hladin jednotlivých typů elektronů v molekule. Elektrony označené * jsou v excitovaném stavu. HOMO je nejvýše obsazený molekulový orbital a LUMO je nejnižší neobsazený molekulový orbital.

2.6.4.1 Elektronové přechody

$\sigma - \sigma^*$ přechody

Energetický rozdíl mezi vazebnými (základní stav) a nevazebnými (excitovaný stav) elektrony je značný (Obr. 17). Absorpční pás lze očekávat v oblasti vzdálené UV ($\lambda < 180$ nm). Experimentální zjištění takového pásu činí obtíže, neboť bychom museli pracovat za hlubokého vakua. Příkladem sloučenin s takovými přechody jsou alifatické uhlovodíky. Z těchto důvodů se používají jako rozpouštědla při měření v ultrafialové a viditelné oblasti, neboť nevykazují v této oblasti měřitelnou absorpci záření [20].

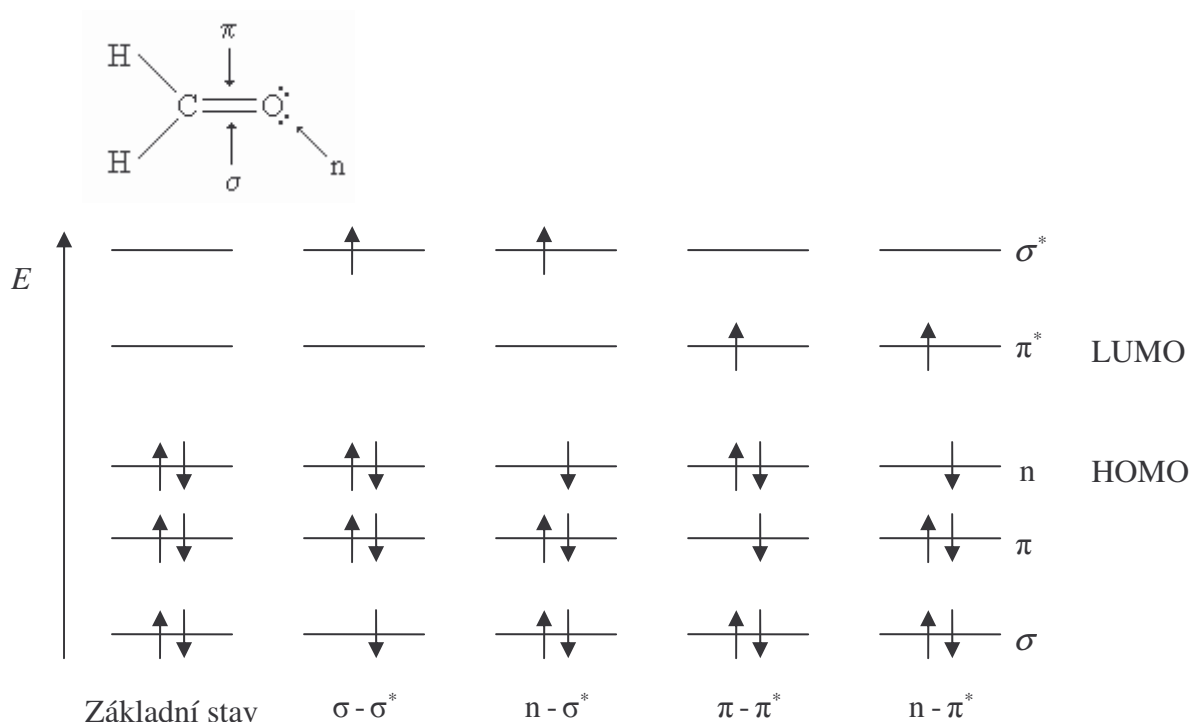
$n - \sigma^*$ přechody

Tyto přechody poskytují substituenty obsahující nevazebné elektrony. Týká se to hlavně nenasyčených sloučenin obsahujících S, N, Br a I, které absorbují v oblasti 200 nm, dále sloučenin obsahujících O a Cl, které absorbují pod 200 nm. Zvyšující se elektronegativita heteroatomů posouvá maxima absorpce k nižším vlnovým délkám. Sloučeniny obsahující kyslík jako voda, alkoholy a ethery absorbují v oblasti pod 200 nm a mohou být použity jako rozpouštědla pro běžná spektrofotometrická měření. Obsahuje-li sloučenina více heteroatomů, dochází k překryvu nevazebných elektronů a absorpční maxima se posouvají k delším vlnovým délkám [20].

$\pi - \pi^*$ a $n - \pi^*$ přechody

Je obvyklé uvažovat tyto přechody společně, neboť mnoho chemických skupin obsahuje jak π , tak n elektrony, takže oba typy přechodů přispívají k tvorbě absorpčních pásů. Příkladem může být karbonylová skupina a další funkční skupiny obsahující kyslík. Příkladem čistého $\pi - \pi^*$ přechodu jsou konjugované systémy dvojných vazeb [20].

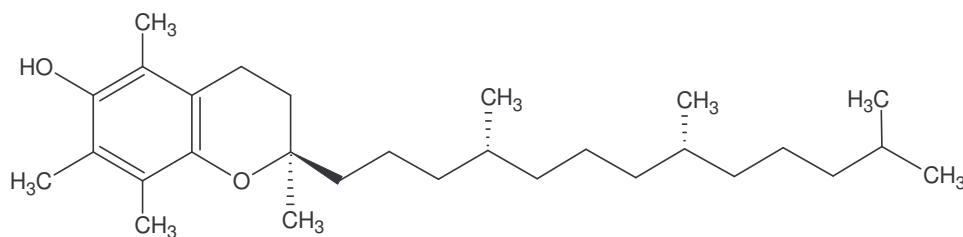
Pro znázornění všech typů elektronových přechodů můžeme použít absorpci molekuly formaldehydu, která obsahuje σ , π a n elektrony (Obr. 18).



Obr. 18 Elektronové přechody molekuly formaldehydu.

2.6.4.2 (\pm)- α -tokoferol (E^α)

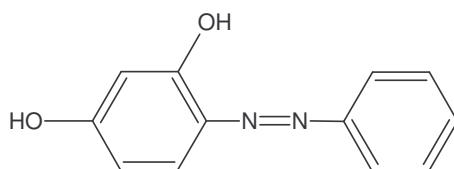
Tokoferoly, souhrnně označované jako vitamín E, jsou přírodní chemické látky, které jsou deriváty 6-hydroxychromanu. Patří mezi vitamíny rozpustné v tucích a v organismu slouží jako důležitý antioxidant, chrání buněčné membrány před poškozením volnými radikály. Jsou tvořené chromanovým kruhem a hydrofobním vedlejším řetězcem, který zapříčiňuje nerozpustnost ve vodě a naopak dobrou rozpustnost v tucích. Tokoferoly proto snadno pronikají do buněčných membrán a stávají se jejich součástí. Na chromanovém kruhu je připojena jedna hydroxylová skupina, která je dárce vodíkových atomů a podmiňuje antioxidační účinek látky, a methylenové skupiny, jejichž různý počet určuje konkrétní tokoferol [23]. Obsahuje-li tokoferol tři methylenové skupiny, jedná se o (\pm)- α -tokoferol (Obr. 19), CAS 10191-41-0, s $M_r = 430,71$ [24].



Obr. 19 α -tokoferol.

2.6.4.3 Sudan Orange G (Sudanová oranž, SOG)

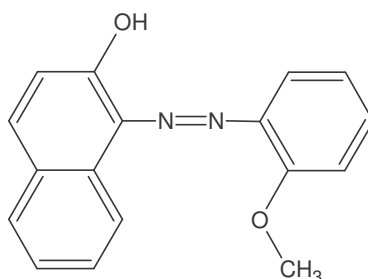
Sudanová oranž (Obr. 20), CAS 2051-85-6, patří do skupiny azobarviv, které obsahují jednu azo skupinu. Má $M_r = 214,22$ a $t_f = 143\text{--}145\text{ }^\circ\text{C}$. Absorbuje při 388 nm [25].



Obr. 20 Sudan Orange G.

2.6.4.4 Sudan Red G (Sudánová červeň, SRG)

Sudánová červeň (Obr. 21), CAS 1229-55-6, patří do skupiny azobarviv, které obsahují jednu azo skupinu. Jedná se o lipofilní barvivo, nerozpustné ve vodě, s $M_r = 278,31$ a s $t_f = 225\text{ °C}$ [26]. Slouží k barvení tuků, olejů, vosků, celulózy a syntetických laků. Je stabilní v oblasti 100–110 °C. Proto se také používá jako potravinové barvivo [27].



Obr. 21 Sudan Red G.

2.7 Fluorescenční spektroskopie

Fluorescenční metody se stále více používají nejen v biochemickém a biofyzikálním výzkumu, ale i v klinické chemii, genetických analýzách, monitorování prostředí a dalších oborech [28]. Z metod využívajících emise záření molekul jsou analyticky nejdůležitější metody fotoluminiscenční, tj. metody, u kterých je emise záření dosahováno excitací vzorku elektromagnetickým zářením [20].

Mezi fotoluminiscenční metody patří fluorescenční spektroskopie. Jedná se o rychlou a citlivou metodu, která slouží k charakterizaci prostředí molekul a jejich dění. Její použití je rozšířené ve výzkumu struktury, funkce a reaktivity malých molekul, syntetických polymerů, proteinu a dalších biologických molekul a také při studiu struktury a funkce buňky [29].

2.7.1 Luminiscence

Luminiscence je vyzařování látky, jejíž termodynamická rovnováha byla porušena vnějším buzením. Jde o přebytek nad tepelným zářením vysílaným ještě po skončení buzení po dobu delší, než odpovídá několika periodám optického záření. Luminiscence je vysílána i při nízkých teplotách na rozdíl od tepelného záření a bývá proto někdy označována jako studené světlo. Luminiscenci lze dělit podle způsobu excitace elektronového systému. Dochází-li k excitaci působením optického záření, potom tuto lumiscenci nazýváme fotoluminiscencí. Z hlediska změny spinové multiplicity dělíme luminiscenci na fluorescenci (bez změny multiplicity) a fosforescenci (se změnou multiplicity). Speciálním případem luminiscence je zbržděná fluorescence a rezonanční fluorescence. Fluorescence,

fosforescence, zpožděná fluorescence a rezonanční fluorescence jsou zářivé přechody, které jsou charakteristické tím, že excitované molekuly přechází z vyššího energetického stavu na nižší energetický stav, přičemž vyzáří kvantum energie ve formě fotonu.

▪ Fluorescence

Fluorescence (Obr. 22) je spinově dovolený přechod na nižší energetický stav se stejnou multiplicitou. Fluorescence většiny mnohoatomových organických molekul obvykle odpovídá přechodu $S_1 \rightarrow S_0$. Před emisí fluorescenčního kvanta obvykle dochází k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, proto fluorescenční přechod nastává nejčastěji z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S_1 . U některých molekul byla pozorována fluorescence z vyššího excitovaného stavu $S_2 \rightarrow S_0$, případně $S_n \rightarrow S_m$ nebo $T_n \rightarrow T_m$, kde $m < n$. Fluorescence je velmi rychlý děj s rychlostní konstantou rovnou 10^6 – 10^9 s⁻¹.

▪ Fosforescence

Fosforescence (Obr. 22) je spinově zakázaný přechod na nižší energetický stav s rozdílnou multiplicitou. Typickým přechodem je $T_1 \rightarrow S_0$, avšak přechod $T_n \rightarrow S_0$ byl také pozorován. Jedná se o pomalý děj s rychlostní konstantou rovnou 10^{-2} – 10^3 s⁻¹.

▪ Zpožděná fluorescence

Zpožděná fluorescence je zářivý přechod z téhož singletního stavu (S_1) jako při fluorescenci, ale s delší dobou dohasínání danou časem, po který je molekula v metastabilním tripletovém stavu [30].

▪ Rezananční fluorescence

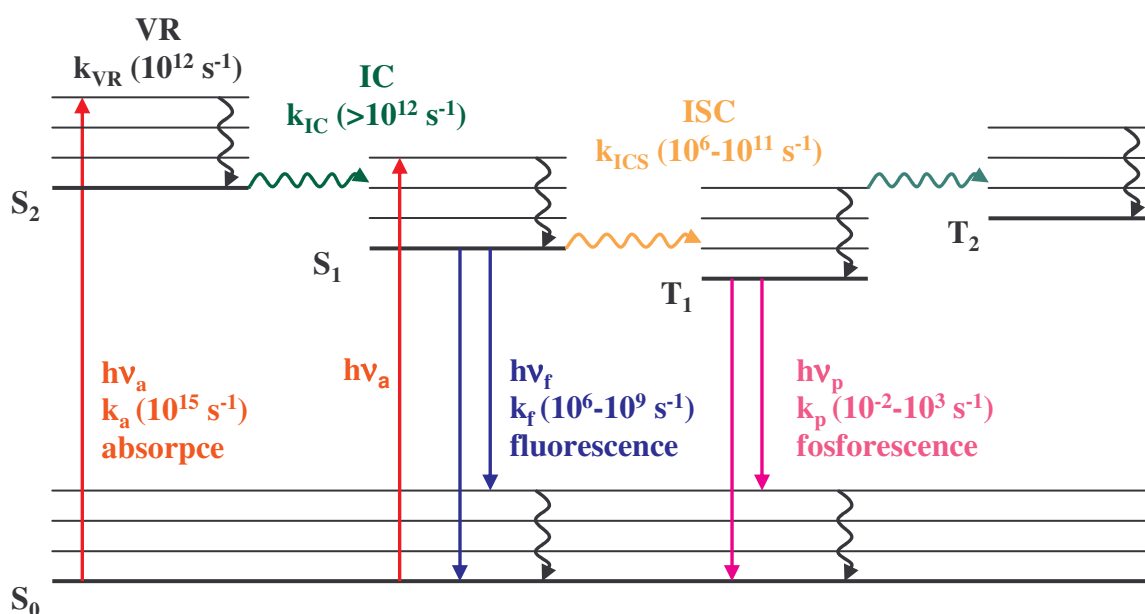
Atomy a malé molekuly v plynném stavu při nízkých tlacích mohou vyzařovat fluorescenci o stejné vlnové délce, jako je vlnová délka excitačního záření. V tomto případě je pravděpodobnost srážek atomů a molekul velmi malá. Molekula nemůže měnit svůj vibrační stav vibrační relaxací a vyzařování probíhá ze stejné vibrační hladiny, která byla původně excitovaná. Zvyšováním tlaku se při srážkách část excitační energie mění na kinetickou energii molekul, přičemž k emisi záření dochází z nižších vibračních hladin a fluorescenční spektrum se posouvá do oblasti vyšších vlnových délek [30].

2.7.2 Jablůnskiho diagram

Jablůnskiho diagram (Obr. 22) je energetický diagram, který znázorňuje energetické stavy molekuly a přechody mezi nimi.

Při absorpci záření přejde molekula na některou vibrační hladinu excitovaného singletového stavu S_1 nebo S_2 . Jedná se o velmi rychlý proces, trvající řádově 10^{-15} s. Molekuly v excitovaném stavu se přebytku energie rychle zbavují a přecházejí do základního vibračního stavu daného elektronového stavu nezářivými přechody. Těmto neradiačním procesům říkáme *vibrační relaxace* (*Vibrational Relaxation, VR*). Při návratu molekuly z excitovaného singletového elektronového stavu na některou z vibračních hladin základního elektronového stavu je vyzářeno záření, jehož vlnová délka je delší než vlnová délka excitujícího záření. Tento proces nazýváme fluorescencí. K fluorescenci ve většině případů dochází ze stavu S_1 . Všechny vyšší energetické stavy jsou deaktivovány vibrační relaxací. Dojde-li k nezářivému přechodu mezi dvěma elektronovými stavy se stejnou multiplicitou, nazýváme tento přechod *vnitřní konverzí* (*Internal Conversion, IC*).

Na obrázku (Obr. 22) si můžeme všimnout, že není vyznačen absorpční přechod ze základního singletového stavu S_0 do excitovaného tripletového stavu T_1 . Pravděpodobnost tohoto přechodu je velmi nízká, neboť jde o proces se změnou multiplicity. Říkáme, že tento přechod je zakázaný. Molekula se však do tohoto excitovaného tripletového stavu může dostat ze singletového stavu nezářivým přechodem, kterému říkáme *mezisystémový přechod* (*Intersystem Crossing, ISC*). Přechod z excitovaného tripletového stavu do stavu základního opět může nastat nezářivými i zářivými přechody. Přechod z tripletového do singletového stavu je méně pravděpodobný než přechod mezi stavy singletovými, proto doba tripletového stavu je mnohem delší než stavu singletového. Zářivý přechod z excitovaného tripletového stavu do stavu základního singletového stavu nazýváme fosforescencí.



Obr. 22 Jablonského diagram. Přehled zářivých (absorpce, fluorescence a fosforescence) a nezářivých přechodů (VR, IC, ISC) a hodnot rychlostních konstant těchto přechodů [31].

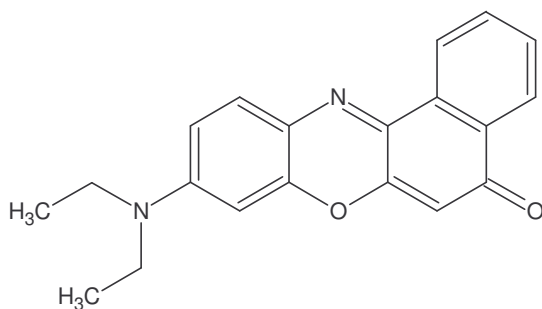
2.7.3 Fluorofory

Molekuly reagující na změny svého okolí změnou optických vlastností se nazývají *fluorofory*. Změna prostředí se může projevit změnou absorpčních či emisních spekter, kvantového výtěžku nebo extinkčních koeficientů. Fluorofory dělíme na vlastní (vnitřní) a nevlastní (vnější). Vlastní fluorofory jsou takové, které fluoreskují přirozeně. Nevlastní fluorofory se přidávají ke vzorkům, které sami o sobě nefluoreskují. Dělíme je na fluorescenční značky, vážící se kovalentně ke zkoumanému vzorku, a fluorescenční sondy, které se váží nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti. Nevlastní fluorescence se při experimentech využívá více než vlastní. Existuje tisíce fluorescenčních sond a jejich správná volba hraje klíčovou roli daného experimentu ve fluorescenční spektroskopii, neboť právě její vlastnosti umožňují získat potřebné informace [32].

2.7.3.1 Nílská červeň (NR)

Nílská červeň (Obr. 23), CAS 7385-67-3, je polaritní fluorescenční sonda s $M_r = 318,37$ a s $t_f = 203\text{--}205\text{ }^\circ\text{C}$ [33], která reaguje na zvyšující se polaritu okolí posunem emisního maxima k vyšším vlnovým délkám.

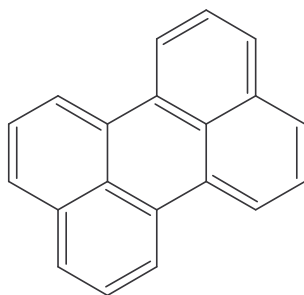
Nílská červeň, stejně jako pyren, může sloužit k určení hodnoty CMC. Ve vodném prostředí je maximum fluorescence při excitační vlnové délce 560 nm lokalizováno ~650 nm. Po překročení hodnoty CMC, kdy dochází k začleňování molekul nílské červeně do hydrofóbního oblasti micel, prudce klesá vlnová délka k hodnotě ~610 nm [34]. CMC se určuje ze závislosti vlnové délky emisního maxima na koncentraci. Hodnota CMC odpovídá průsečíku konstantního a klesajícího trendu.



Obr. 23 Nílská červeň.

2.7.3.2 Perylen (Pe)

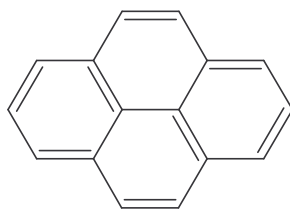
Perylen (Obr. 24), CAS 198-55-0, je hydrofóbní fluorescenční sonda reagující na polaritu a viskozitu prostředí s $M_r = 252,31$ a s $t_f = 276\text{--}279\text{ }^\circ\text{C}$ [35], která patří do skupiny polycyklických aromatických uhlovodíků. Rozpouští se v nepolárních rozpouštědlech. Vykazuje modrou fluorescenci. Používá se v cytochemii buněčných membrán [36]. Má optoelektronické vlastnosti. Některé jeho deriváty mohou sloužit jako pigmenty tvořící fotonosič nebo jako barviva solárních článků [37]. Jeho emisní spektrum je obrazem absorpčního. Má rozlišenou vibrační strukturu emisního spektra. Při excitační vlnové délce 408 nm je přechod 0–0 lokalizován u vlnové délky ~441 nm, přechod 0–1 u ~466 nm a přechod 0–2 u ~500 nm.



Obr. 24 Perylen.

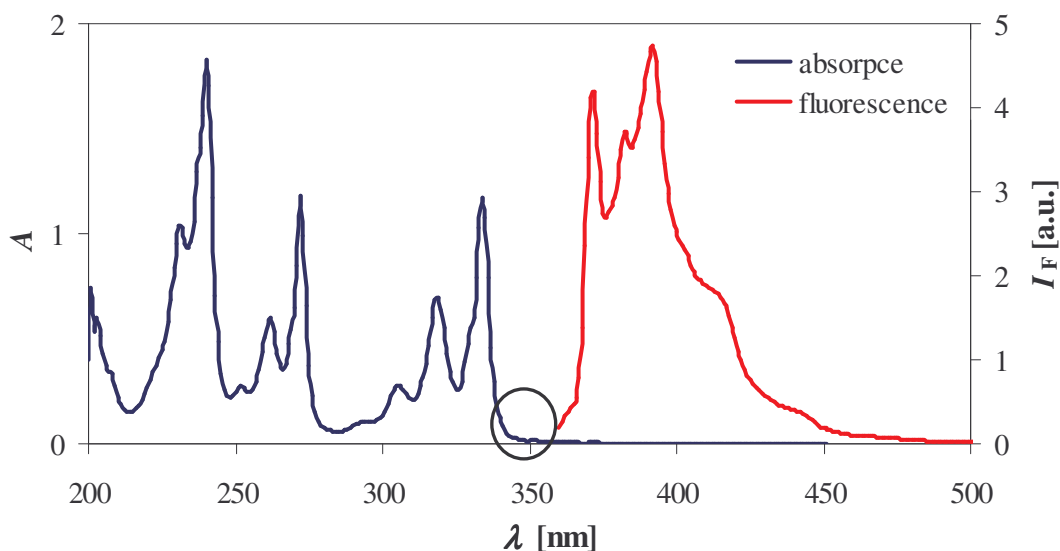
2.7.3.3 Pyren (Py)

Pyren (Obr. 25), CAS 129-00-0, je důležitá polaritní fluorescenční sonda s $M_r = 202,25$ a s $t_f = 145\text{--}148\text{ }^\circ\text{C}$ [38], která slouží k charakterizaci micelární struktury a k studiu hydrofóbních vlastností. Jedná se o polycyklický aromatický uhlovodík s vysokou symetrií.



Obr. 25 Pyren.

Jeho emisní spektrum není zrcadlovým obrazem absorpčního (Obr. 26). Je to dáno tím, že k emisi nedochází z hlavního povoleného absorpčního pásu, který leží v oblasti ~ 335 nm, nýbrž ze zakázaného absorpčního pásu ležícího v oblasti ~ 340 nm. Je to oblast vlnových délek, kde je zakázaná absorpce, avšak povolená emise. Tento efekt dává pyrenu jeho specifičnost, neboť v závislosti polohy emisních píků na polaritě prostředí nedochází téměř k žádnému posunu, jak je běžné u jiných polaritních sond. Změna polarity prostředí se zde projeví změnou intenzity fluorescence, respektive změnou poměru intenzit fluorescence píků, který je závislý na polaritě prostředí, a referenčního píku.



Obr. 26 Absorpční a emisní spektrum pyrenu v prostředí methanolu ($c_{Py} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Zakroužkovaná oblast poukazuje na oblast zakázané absorpce.

V koloidních roztocích má pyren dobře rozlišenou vibrační strukturu emisního spektra. Přejchod 0–0 závislý na polaritě okolí, značený jako „1“ (I_1 nebo také I_m) je lokalizován u vlnové délky 373 nm. Referenčním pásem je přechod 0–2 u 383 nm, značený jako „3“ (I_3). Dále je ve spektru přechod 0–4 značený jako „5“, který je lokalizovaný při 393 nm. Přechody 0–1 a 0–3 bývají rozlišeny pouze v čistých rozpouštědlech a vyšších koncentracích. Poměr intenzity fluorescence prvního a třetího píku je obrazem polarity okolí pyrenu. V polárním prostředí dosahuje hodnot $\sim 1,7$ a v nepolárním $\sim 0,5$. Obecně je tato hranice polárního a nepolárního prostředí brána jako hodnota poměru 1,0 [34].

Jestliže je koncentrace pyrenu vysoká, excitovaná molekula pyrenu formuje *excitovaný dimer* (*excimer*). Excimer je dimer v excitovaném stavu, který se formuje srážkou mezi excitovanou molekulou a identickou neexcitovanou molekulou. Emisní pík excimeru (I_e) je lokalizován u 470 nm [39].

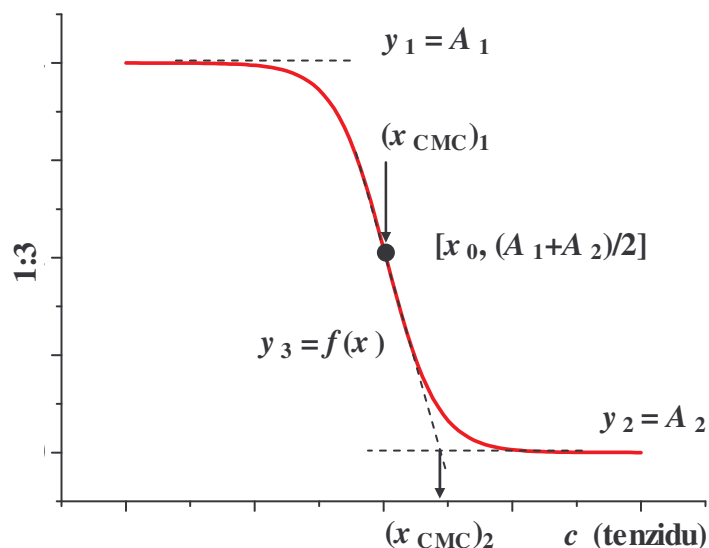
Charakteristická závislost fluorescence vibrační struktury emisního spektra pyrenu se používá k určení CMC. Tato metoda se označuje jako metoda poměru 1:3. Poměr 1:3 vyjadřuje poměr hodnot intenzity fluorescence u pásu 1 a 3. Závislost poměru 1:3 na koncentraci tenzidu v okolí CMC vykazuje typický sigmoidální pokles. Pod CMC hodnota poměru 1:3 odpovídá polaritě prostředí. Pokud koncentrace tenzidu v okolí CMC roste, poměr 1:3 rapidně klesá, což indikuje přítomnost pyrenu ve více hydrofóbním prostředí. Pod CMC poměr 1:3 dosáhne konstantní hodnoty, protože dojde k začlenění molekul pyrenu do hydrofóbní oblasti micel.

Závislost poměru 1:3 na koncentraci tenzidu (Obr. 27) lze popsat Boltzmannovou S-křivkou:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{(x-x_0)}{\Delta x}}} + A_2, \quad (9)$$

kde y odpovídá poměru 1:3, x je proměnná koncentrace tenzidu, A_1 a A_2 je maximální a minimální limitní hodnota S-křivky, x_0 je inflexní bod a Δx je gradient [40].

Tato závislost nabízí 3 body, které mohou určit hodnotu CMC. První zlom, průsečík maxima a lineárního proložení klesající části, inflexní bod a průsečík minima a lineárního proložení klesající části. První z možností není brána v úvahu, kvůli vytváření pre-micelárních útvarů. Volbu mezi druhou $(x_{\text{CMC}})_1 = x_0$ a třetí $(x_{\text{CMC}})_2 = x_0 + 2\Delta x$ možností je třeba provést za pomoci jiného experimentu určujícího CMC [34]. Experimentálně bylo zjištěno, že pro neiontové tenzidy hodnota CMC odpovídá bodu $(x_{\text{CMC}})_1$ a pro iontové bod $(x_{\text{CMC}})_2$ [40].



Obr. 27 Boltzmannova S-křivka. Metoda poměru 1:3 [39].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

<i>Solubilizované látky</i> <ul style="list-style-type: none">• <i>Perylene</i>: assay $\geq 99,0$ % (HPLC), puriss. for fluorescence, Fluka GmbH• <i>Sudan Orange G</i>: assay $\geq 98,0$ % (HPLC), Riedel-de Haën GmbH• <i>Sudan Red G</i>: Standard Fluka, reagent for Ph. Eur., Fluka GmbH• (\pm)-α-<i>Tocopherol</i>: assay $\geq 97,0$ % (HPLC), Fluka GmbH
<i>Fluorescenční sondy</i> <ul style="list-style-type: none">• <i>Nile Red</i>: BioChemika, assay $\geq 98,0$ % (HPLC), puriss. for fluorescence, Fluka GmbH• <i>Perylene</i>: assay $\geq 99,0$ % (HPLC), puriss. for fluorescence, Fluka GmbH• <i>Pyrene</i>: assay $\geq 99,0$ % (GC), puriss. p.a. for fluorescence, Fluka GmbH
<i>Tenzid</i> <ul style="list-style-type: none">• <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>: assay $\geq 99,0$ % (GC), ultra for molecular biology, Fluka GmbH
<i>Deriváty kyseliny hyaluronové</i> <ul style="list-style-type: none">• <i>DEC-NH-HA 100/10</i>: CPN spol. s r.o.• <i>DEC-NH-HA 100/30</i>: CPN spol. s r.o.• <i>DEC-NH-HA 100/50</i>: CPN spol. s r.o.
<i>Elektrolyt</i> <ul style="list-style-type: none">• <i>Chlorid sodný</i>: Lach-Ner, s.r.o.
<i>Rozpouštědla</i> <ul style="list-style-type: none">• <i>Acetone</i>: assay $\geq 99,7$ % (GC), ACS reagent, for UV-spectroscopy, Fluka GmbH• <i>Cyklohexane</i>: Riedel-de Haën GmbH• <i>Dichloromethane</i>: LabGrade ACS, Merck, s.r.o.• <i>n-heptan</i>: Lach-Ner, s.r.o.• <i>Chloroform</i>: assay $\geq 99,8$ % (CHCl_3 + ethanol, GC), for UV-spectroscopy, Fluka GmbH• <i>Methanol</i>: assay $\geq 99,8$ % (GC), for UV-spectroscopy, Fluka GmbH• <i>1-Propanol</i>: assay $\geq 99,8$ % (GC), for UV-spectroscopy, Fluka GmbH• <i>Water</i>: for injection, Fresenius Kabi s.r.o.

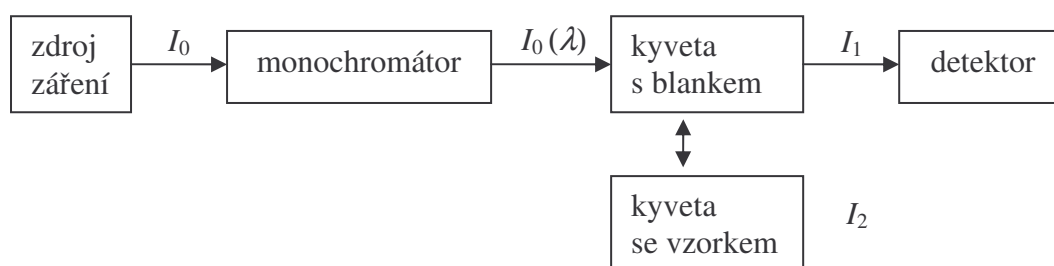
3.2 Použité přístroje

<i>Analytické váhy</i>	Denver Instrument
<i>Automatické pipety</i>	BioHit mLine
<i>Magnetické míchadlo</i>	Heidolph MR 3002, Variomag Poly 15
<i>Rotační míchadlo</i>	Heidolph Reax 2
<i>Vibrační míchadlo</i>	Heidolph Vibramax 100
<i>Ultrazvuková lázeň</i>	Sonorex Digitec DT 31 H, Bandelin
<i>UV-VIS spektrofotometr</i>	Cary 50 Probe, Varian
<i>Luminiscenční spektrometr</i>	AMINCO-Bowman, Series 2

▪ **Cary 50 Probe, Varian**

Zdroj	xenonová lampa
Monochromátor	Czerny-Turner 0,25 m
Detektor	dvojitá křemíková dioda
Rozmezí λ	190–1100 nm
Opakovatelnost λ	$\pm 0,1$ nm
Maximální rychlost skenu	24000 nm/min
Měření vzorků	do absorbance 3

Cary 50 Probe (Obr. 28) je spektrofotometr s jednopaprskovým uspořádáním. Polychromatické záření I_0 z primárního zdroje vstupuje do monochromátoru, který vybere paprsek o určité vlnové délce $I_0(\lambda)$. Tento paprsek prochází nejdříve křemennou kyvetou obsahující tzv. blank (srovnávací roztok), kde je zeslaben I_1 . Po dopadu na detektor vyvolá fotoelektrický proud, který je změřen a je mu přiřazena nulová hodnota absorbance. Po výměně srovnávacího roztoku za měřený je změřena absorbance neznámého vzorku. Všechna měření probíhala při laboratorní teplotě (20–25 °C).

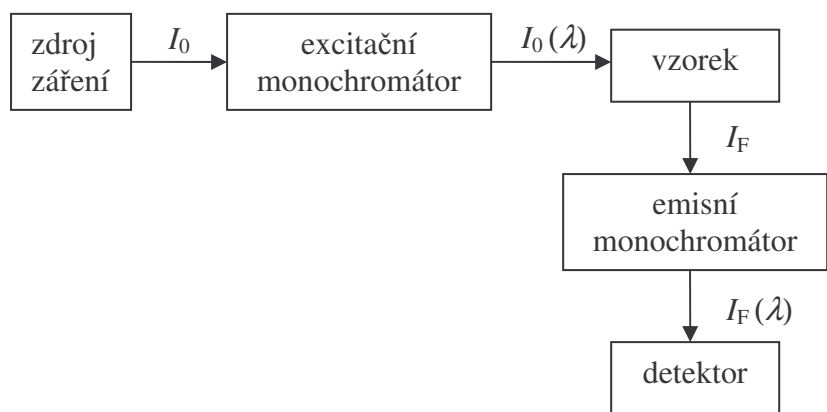


Obr. 28 Schéma jednopaprskového UV-VIS spektrofotometru Cary 50 Probe, Varian, který se skládá ze zdroje záření, monochromátoru, kyvetového prostoru a detektoru.

▪ **AMINCO-Bowman, Series 2**

Zdroj	xenonová lampa 150 W, záblesková lampa 7 W
Monochromátor	mřížka konkávní holografická, iontově lepená
Rozmezí λ	220–850 nm
Přesnost λ	$\pm 0,5$ nm
Opakovatelnost λ	$\pm 0,25$ nm
Rozsah rychlosti měření	3–6000 nm/min

AMINCO-Bowman, Series 2 (Obr. 29) je luminiscenční spektrometr s jednopaprskovým uspořádáním. Polychromatické záření I_0 z primárního zdroje vstupuje do excitačního monochromátoru, který vybere záření o definované vlnové délce excitace. Selektivní paprsek prochází křemennou kyvetou se vzorkem, kde dochází k excitaci elektronů zkoumaného vzorku. Fluorescence je pozorována v kolmém směru paprsku primárního záření, aby primární záření procházející kyvetou nerušilo měření fluorescence. Emisní monochromátor a detektor jsou proto umístěny v kolmém směru ke kyvetě. Emisní záření prochází emisním monochromátorem, kde je nastavena jeho vlnová délka (Tab. IV). Pomocí detektoru je zjištěna intenzita fluorescence. Teplota cely s kyvetou byla řízena oběhovým termostatem Grant s externím chlazením. Všechna měření probíhala při teplotě $20 \pm 0,1$ °C.



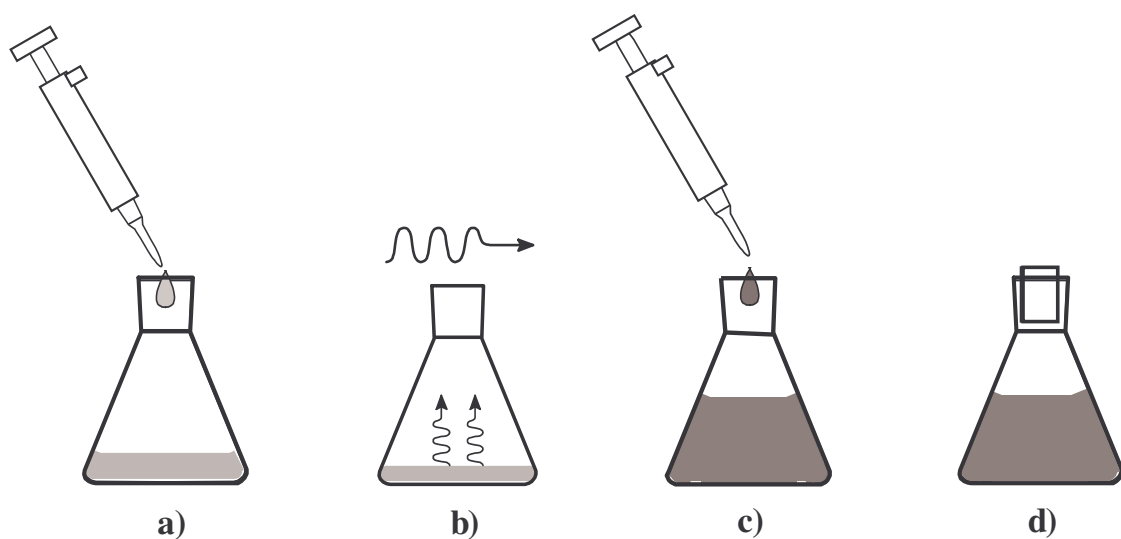
Obr. 29 Schéma jednopaprskového luminiscenčního spektrometru AMINCO-Bowman, Series 2, který se skládá ze zdroje záření, excitačního monochromátoru, kyvetového prostoru emisního monochromátoru a detektoru.

Tab. IV Nastavení parametrů pro měření na AMICO-Bowman, Series 2.

Fluorescenční sonda	Excitace [nm]	Emise [nm]	Emisní sken [nm]
NR	~550	610	570–750
Pe	408	440	420–600
Py	335	392	360–530

3.3 Princip přípravy vzorků

Příprava vzorků měla několik kroků (Obr. 30). Nejdříve bylo do 8 mL vialek pomocí automatické pipety nadávkováno potřebné množství příslušné látky (solubilizační látka, fluorescenční sonda). Tato látka byla rozpuštěna v těkavém rozpouštědle (aceton, chloroform, dichlormethan), které bylo odstraněno pomocí sníženého tlaku proudem vzduchu, látka tak zůstala na skleněném povrchu. Nyní bylo nadávkováno 5 mL zkoumaného roztoku. Následovalo 24 hodinové třepání potřebné k solubilizaci látky a poté proměření vzorků.



Obr. 30 Schéma přípravy vzorků. a) dávkování látky, b) odpařování rozpouštědla pomocí sníženého tlaku proudem vzduchu, c) dávkování zkoumaného vzorku a d) 24 h třepání.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Chování použitých látek v různých prostředích

Dříve, než bylo přistoupeno k samotným solubilizačním experimentům, bylo nutné zvolené látky podrobit studiu jejich chování v prostředích s různou iontovou silou, které byly zvoleny pro solubilizační experimenty, a v různě polárních prostředích k ověření chování některých látek, které jsou uváděny jako polaritní sondy.

V roztoku dochází mezi látkou a molekulami prostředí k různým typům interakcí, které jsou představovány van der Waalsovou silou a některými specifickými interakcemi (vodíkový můstek). Kvalita těchto interakcí je vyjadřována polaritou. Obecně jako polární molekulu označujeme tu, která má nenulový dipól moment. Ve fluorescenční spektroskopii neuvažujeme pouze interakce permanentních dipólů látky a rozpouštědla, ale i interakce založené na polarizovatelnosti daných molekul. Pojem „polarita“ (někdy mluvíme o mikropolaritě) tedy zahrnuje nespecifické interakce (dipól moment, polarizovatelnost) a specifické interakce. Z tohoto důvodu polarita nemůže být charakterizována pouze relativní permitivitou (makroskopické měřítko, týká se prostředí) nebo dipól momentem (mikroskopické měřítko, týká se molekul) [34]. Jedna z možností vyjádření polaritativity může být pomocí orientační polarizovatelnosti Δf , která propojuje vlastnosti molekuly (relativní permitivita, ϵ_r) a vlastnosti prostředí (index lomu, n_D^{20}):

$$\Delta f = f(\epsilon) - f(n^2) = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}, \quad (10)$$

Relativní permitivita zde vyjadřuje reakci dané látky na elektrické pole (příspěvek dipól momentu) a index lomu vyjadřuje šíření elektromagnetická interakce v daném prostředí [39].

Posuny absorpčních a emisních pásů mohou být indukované změnou povahy prostředí nebo jeho složením. Tyto posuny se nazývají *solvatochromní posuny*. Látky označujeme jako solvatochromní, jestliže poloha jejich absorpčního a emisního spektra závisí na polaritě prostředí. Bathochromní (červený) posun a hypsochromní (modrý) posun s rostoucí polaritou přísluší pozitivnímu a negativnímu solvatochromismu.

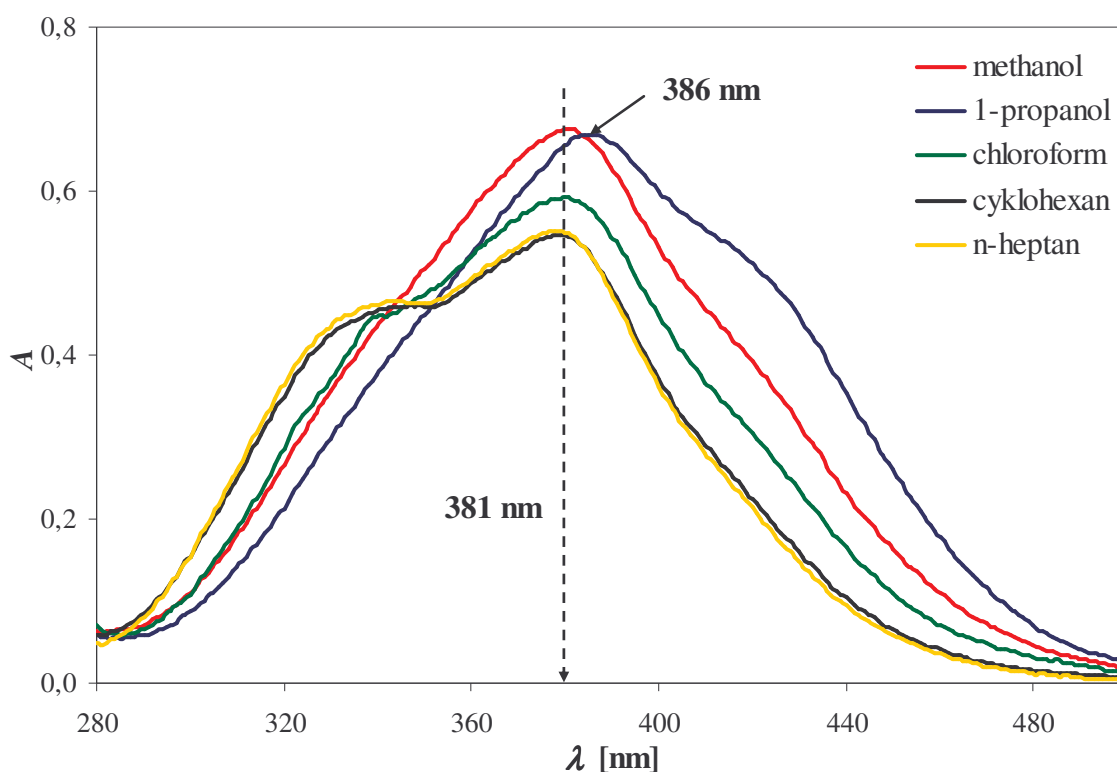
Pro charakteristiku chování látek v různě polárních prostředích byla zvolena řada rozpouštědel: methanol, 1-propanol, chloroform, cyklohexan a n-heptan. Jejich relativní permitivity, indexy lomu a orientační polarizovatelnosti jsou uvedeny v tabulce (Tab. V). Jako prostředí s různou iontovou silou byly zvolené tři prostředí a to voda, 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl. Tato prostředí je také možno charakterizovat jako polární.

Tab. V Hodnoty různých polaritních indexů.

Prostředí	ϵ_r [39]	n_D^{20} [41]	Δf [39]
voda	80,37	1,333	0,3201
methanol	33,62	1,329	0,3090
1-propanol	20,33	1,380	0,2739
chloroform	4,81	1,443	0,1482
cyklohexan	2,02	1,426	-0,0014
n-heptan	1,92	1,388	-0,0002

4.1.1 Charakteristika Sudan Orange G v různých prostředích

Byla měřena absorpční spektra různě polárních roztoků SOG o koncentraci $3,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Z absorpčního spektra (Obr. 31) je vidět, že polohy maxim absorpčních pásů jsou lokalizovány při vlnové délce 381 nm. Poloha maxima v závislosti na polaritě prostředí se nemění. Pouze v případě prostředí 1-propanolu dochází k bathochromnímu posunu maxima absorbance o 5 nm. Velikost a tvar absorpčního pásu již změnám podléhá. Se vzrůstající polaritou prostředí v souladu s relativní permitivitou (Tab. V) roste hodnota maxima absorbance. U nepolárnějších prostředí absorpční pás vykazuje nárůst absorbance v oblastech nižších vlnových délek, zatímco u polárnějších látek je tomu naopak, kde k nárůstu absorbance dochází v oblastech vyšších vlnových délek. Tyto změny tvaru absorpčních pásů jsou způsobené změnou elektronového stavu molekuly. Z nenulové hodnoty absorbance vzorku z absorpčního spektra pro prostředí s různou hodnotou iontové síly (voda, 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl) bylo zjištěno, že se SOG částečně v těchto prostředích rozpouští. Barvivo není tak lipofilní, jak bylo předpokládáno z jeho struktury (Obr. 20) (delokalizovaný systém π elektronů).

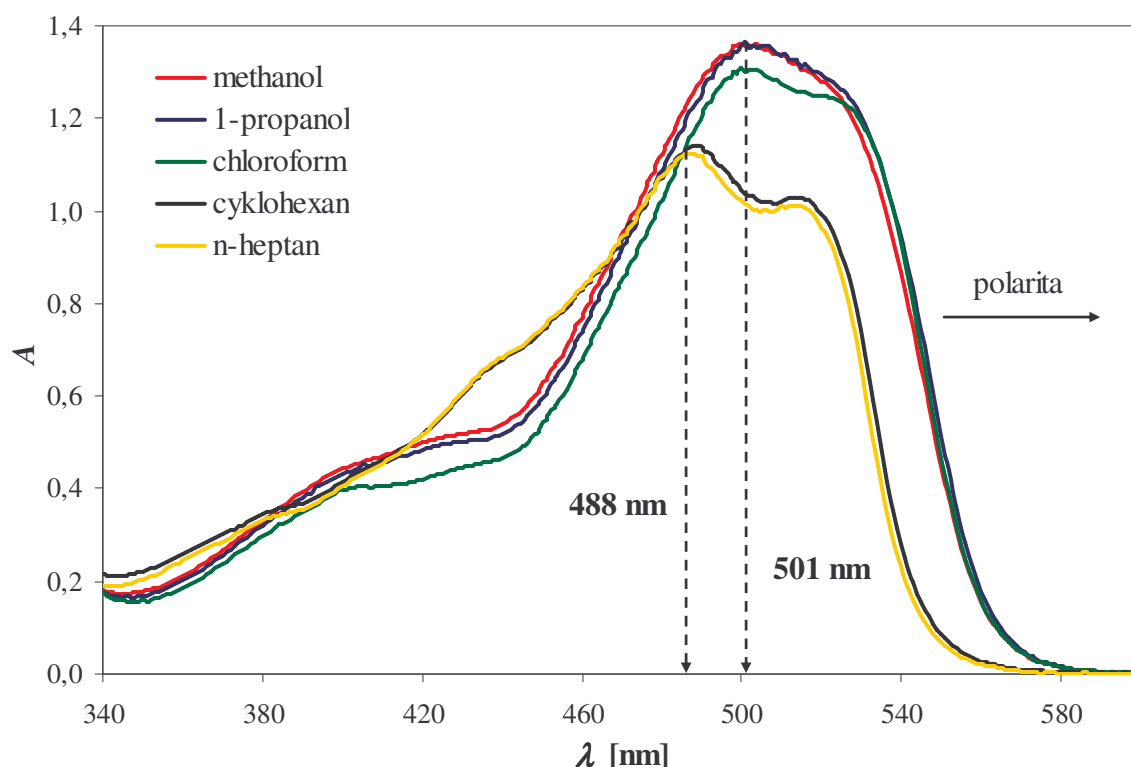


Obr. 31 Absorpční spektra SOG v různě polárních prostředích ($c_{\text{SOG}} = 3,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Změnou polarity prostředí nedochází ke změně polohy maxima absorpce až na výjimku SOG v prostředí 1-propanolu, kdy dochází k bathochromnímu posunu o 5 nm.

4.1.2 Charakteristika Sudan Red G v různých prostředích

Byla měřena absorpční spektra různě polárních roztoků SRG o koncentraci $6,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Z absorpčního spektra (Obr. 32) je vidět, že polohy maxim absorpčních pásů jsou lokalizovány v oblasti vlnových délek 488–501 nm. Poloha, velikost a tvar absorpčních pásů závisí na polaritě prostředí. Se vzrůstající polaritou prostředí v souladu s relativní permitivitou (Tab. V) roste hodnota maxima absorbance a jeho poloha vykazuje

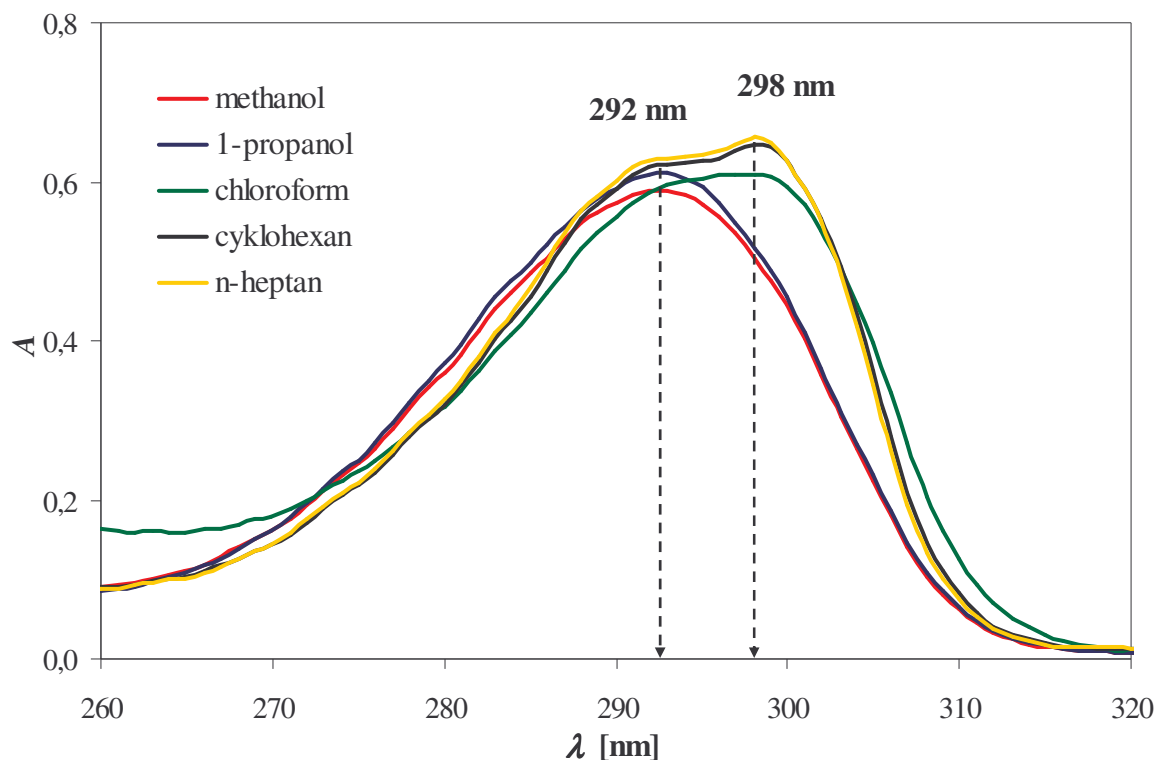
bathochromní posun o 13 nm. U polárnějších rozpouštědel se absorpční pás vykresluje jako jeden pík. V případě méně polárních až nepolárních rozpouštědel dochází k rozdělování píku z důvodu změny elektronového stavu molekuly SRG. Z nulové hodnoty absorbance vzorku z absorpčního spektra pro prostředí s různou hodnotou iontové síly (voda, 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl) vyplývá předpoklad, že se SRG bude solubilizovat do nejhydrofóbnějších oblastí domén.



Obr. 32 Absorpční spektra SRG v různě polárních prostředích ($c_{SRG} = 6,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Změnou polaritě prostředí dochází k změně polohy maxima absorpce a také ke změně elektronového stavu molekuly SRG, což má za následek „rozdělení“ absorpčního píku.

4.1.3 Charakteristika (\pm)- α -tokoferolu v různých prostředích

Byla měřena absorpční spektra různě polárních roztoků E $^{\alpha}$ o koncentraci $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (Obr. 33). Absorpční maxima jsou lokalizována v oblasti vlnových délek 292–298 nm. Poloha maxima absorbance s rostoucí polaritou prostředí v souladu s relativní permitivitou (Tab. V) vykazuje hypsochromní posun o 6 nm od nejméně polárního prostředí (n-heptan) po nejpolárnějšího prostředí (methanol). S klesající polaritou prostředí docházelo k hypochromnímu posunu. Z nulové hodnoty absorbance vzorku z absorpčního spektra pro prostředí s různou hodnotou iontové síly (voda, 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl) bylo zjištěno, že E $^{\alpha}$ stejně jako SRG je vhodný pro studium solubilizace do nejhydrofóbnějších oblastí domén. I když E $^{\alpha}$ vykazuje emisi záření, byla proměřena pouze absorpční spektra.



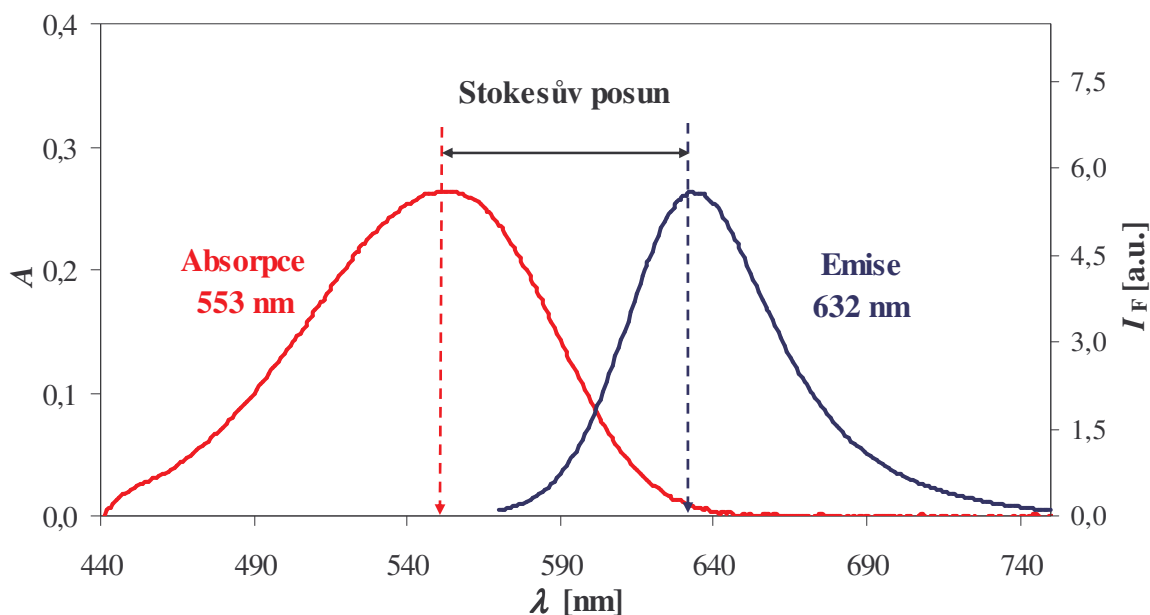
Obr. 33 Absorpční spektra E^α v různě polárních prostředích ($c_{E^\alpha} = 2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Změnou polaritý prostředí dochází k změně polohy maxima absorpce a také ke změně elektronového stavu molekuly E^α , což má za následek „rozdvojení“ absorpčního píku.

4.1.4 Charakteristika Nilské červeně v různých prostředích

Byla měřena absorpční a emisní spektra různě polárních roztoků NR o koncentraci $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (Tab. VI). Jelikož se jedná o známou polaritní sondu, byl předpokládán vliv polaritý prostředí na polohu absorpčních a emisních maxim. Absorpční maxima jsou lokalizovány v oblasti vlnových délek 542–553 nm a emisní maxima jsou lokalizovány v oblasti vlnových délek 596–632 nm. Poloha maxima absorpce a emise s rostoucí polaritou prostředí v souladu s relativní permitivitou (Tab. V) vykazuje bathochromní posun. V tabulce naměřených hodnot absorpčních a emisních spekter (Tab. VI) pro výraznou spektrální odlišnost nebyly spektra v cyklohexanu a n-heptanu uvažována. Emisní spektrum NR je zrcadlovým obrazem absorpčního spektra (Obr. 34). Z nulové hodnoty absorpce vzorku z absorpčního spektra pro prostředí s různou hodnotou iontové síly (voda, 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl) bylo zjištěno, že NR stejně jako SRG a E^α je vhodný pro studium solubilizace do nejhydrofóbnějších oblastí domén.

Tab. VI Hodnoty absorpčních a emisních spekter NR.

Prostředí	Absorpce			Emise	
	λ_{max} [nm]	A_{max}	$\epsilon_{\text{max}} \cdot 10^3 [\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}]$	λ_{max} [nm]	I_F [a.u.]
methanol	553	0,264	8,8	632	5,6
1-propanol	547	0,258	8,6	627	7,8
chloroform	542	0,279	9,3	596	5,7



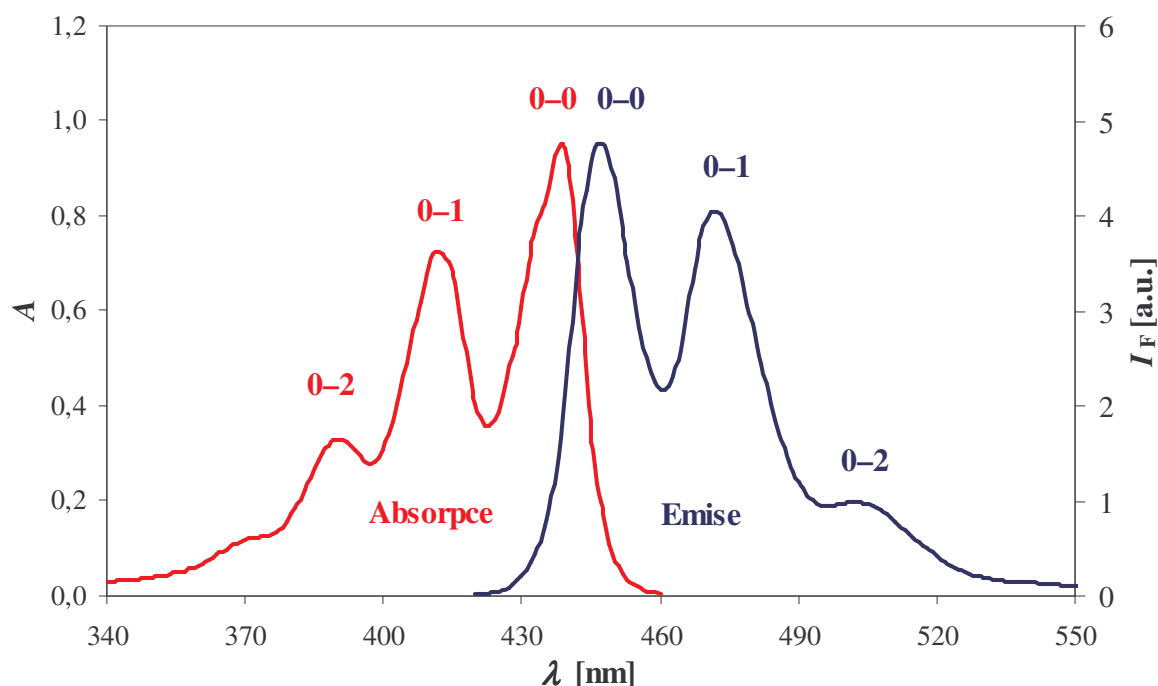
Obr. 34 Absorpční a emisní spektrum NR v prostředí methanolu ($c_{NR} = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). V grafu je naznačen Stokesův posun o 79 nm.

4.1.5 Charakteristika perylenu v různých prostředích

Byla měřena absorpční a emisní spektra různě polárních roztoků Pe o koncentraci $2,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Absorpční maxima elektronového přechodu 0–0 jsou lokalizovány v oblasti vlnových délek 434–439 nm a emisní maxima jsou lokalizovány v oblasti vlnových délek 441–447 nm. Poloha maxima absorbance s rostoucí polaritou prostředí v souladu s relativní permitivitou (Tab. V) vykazuje bathochromní posun po prostředí chloroformu a poté hypsochromní posun, u polohy maxima emise je tomu naopak. Pe má dobře rozlišenou elektronovou strukturu jak absorpčního spektra, tak emisního spektra, který je jeho obrazem. Na obrázku absorpčního a emisního spektra Pe v prostředí chloroformu (Obr. 35) můžeme vidět absorpční přechody 0–0 (439 nm), 0–1 (412 nm) a 0–2 (390 nm) a emisní přechody 0–0 (447 nm), 0–1 (472 nm) a 0–2 (502 nm). Jelikož hodnota absorpce, tzn. že i hodnota molárního extinkčního koeficientu, pro přechod 0–0 je nejvyšší, je tento přechod také nejpravděpodobnější. Proto v tabulce (Tab. VII) jsou uvedeny hodnoty pouze pro tento elektronový přechod. Z nulové hodnoty absorbance vzorku z absorpčního spektra pro prostředí s různou hodnotou iontové síly (voda, 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl) bylo zjištěno, že Pe stejně jako SRG, E^α a NR je vhodný pro studium solubilizace do nejhydrofóbnějších oblastí domén.

Tab. VII Hodnoty absorpčních a emisních spekter Pe.

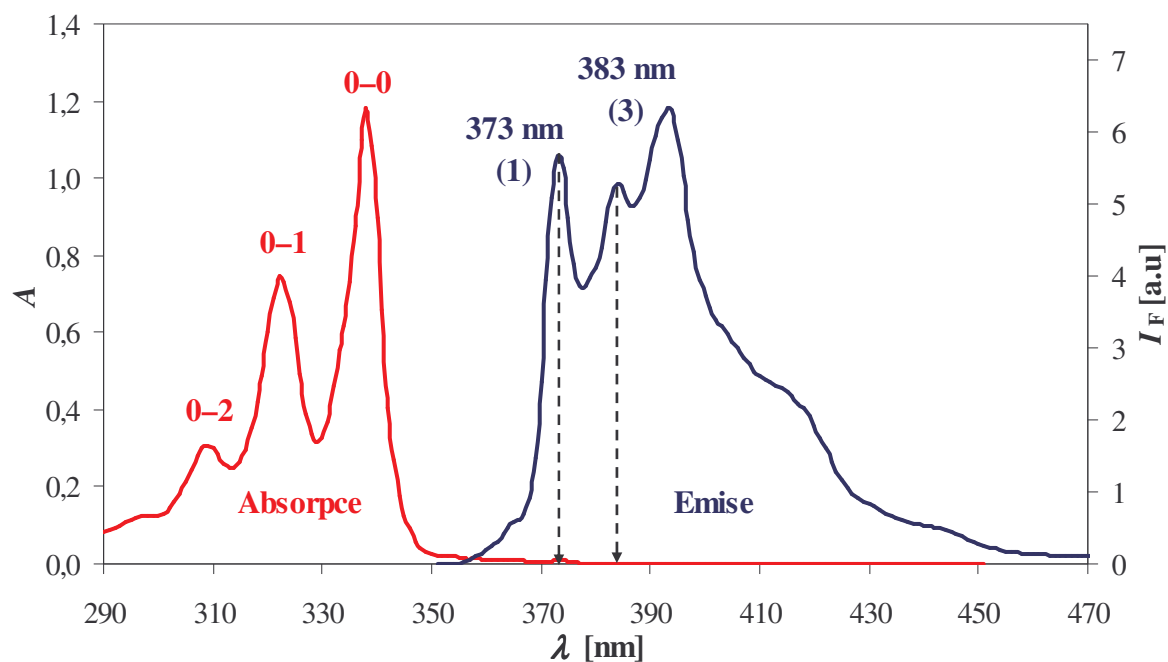
Prostředí	Absorpce (0–0)			Emise (0–0)	
	λ_{max} [nm]	A_{max}	$\varepsilon_{\text{max}} \cdot 10^3 [\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}]$	λ_{max} [nm]	I_F [a.u.]
methanol	434	0,948	41,2	441	5,3
1-propanol	436	0,943	41,0	443	5,6
chloroform	439	0,951	41,3	447	4,8
cyklohexan	436	1,032	44,9	443	5,1
n-heptan	435	0,919	40,0	443	4,4



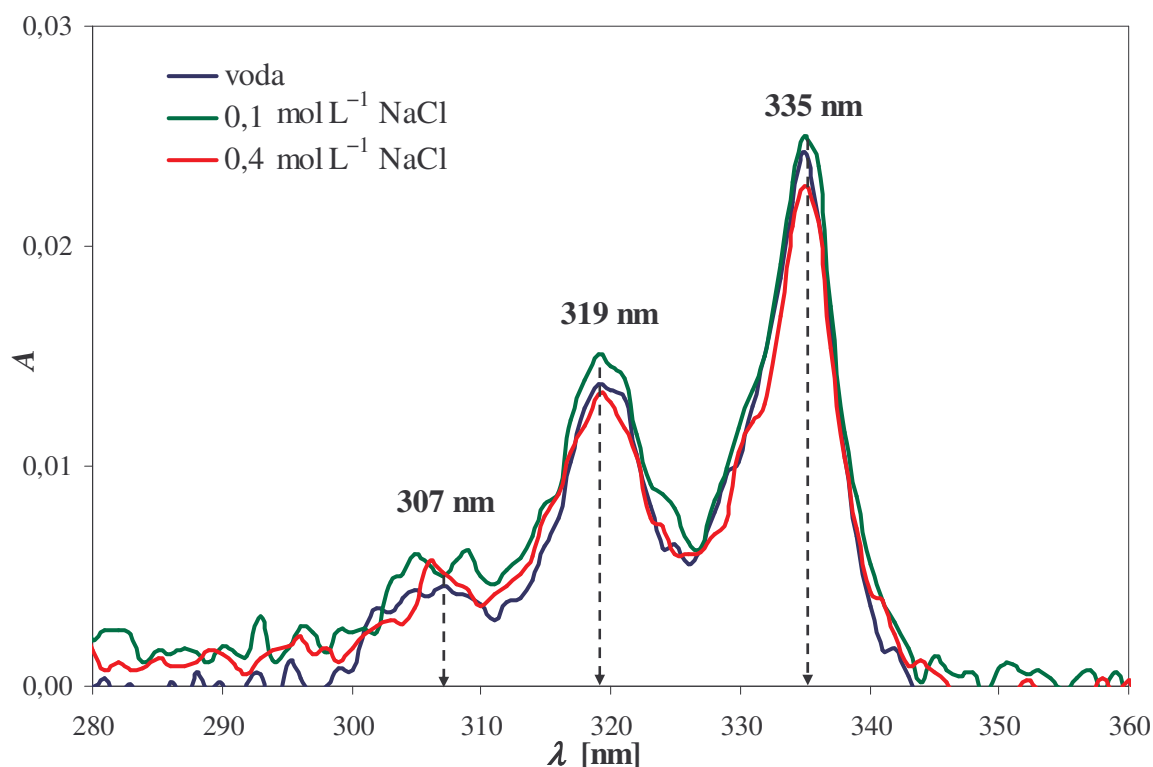
Obr. 35 Absorpční a emisní spektrum *Pe* v prostředí chloroformu ($c_{Pe} = 2,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) s rozlišenou elektronovou strukturou, kde 0–0, 0–1 a 0–2 představují jednotlivé vibronové přechody. Emisní spektrum *Pe* je obrazem absorpčního. Stokesův posun hlavních maxim (nejpravděpodobnější) je 8 nm.

4.1.6 Charakteristika pyrenu v různých prostředích

Byla měřena absorpční a emisní spektra různě polárních roztoků Py o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Jedná se o polaritní sondu, proto předpokládáme vliv změny polarity prostředí na změnu absorpčního i emisního spektra. Absorpční spektrum Py má rozlišenou elektronovou strukturu s přechody 0–0 (~335 nm), 0–1 (~320 nm) a 0–2 (~305 nm) s nejpravděpodobnějším elektronovým přechodem 0–0. Z absorpčního a emisního spektra Py v chloroformu (Obr. 36) si můžeme všimnout, že emisní spektrum není zrcadlovým obrazem absorpčního spektra. Je to způsobeno tím, že emisní spektrum je zrcadlovým obrazem zakázané absorpce, která je lokalizovaná v oblasti vlnových délek ~340 nm. To má za následek to, že emisní spektrum Py nereaguje na změnu polarity změnou polohy emisního maxima ale změnou velikosti intenzity fluorescence, respektive změnou poměru intenzit 1:3. Ačkoliv se jedná o látku s vysokou symetrií (pravidelný delokalizovaný systém π elektronu), vykazuje Py detekovanou absorpci v prostředí vody, 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl (Obr. 37). I přes to je Py vhodný pro studium hydrofóbních oblastí domén. Hodnoty absorpčních a emisních spekter najdeme v tabulce (Tab. VIII).



Obr. 36 Absorpční a emisní spektrum Py v prostředí chloroformu ($c_{Py} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) s dobře rozlišenou elektronovou strukturou emisního spektra. Emisní spektrum Py není zrcadlovým obrazem absorpčního, jelikož emisní spektrum je obrazem zakázané absorpce ($\sim 340 \text{ nm}$).



Obr. 37 Absorpční spektrum Py v prostředích s různou iontovou silou (voda, 0,1 a 0,4 mol L^{-1} NaCl) ($c_{Py} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Vykreslení jednotlivých křivek nemá hladký průběh, jelikož se jedná o velmi malou absorpci do 0,025 s hodnotou molárního extinkčního koeficientu hlavního absorpčního maxima rovnou $1000 \text{ mol}^{-1} \text{ m}^2$.

Tab. VIII Hodnoty absorpčních a emisních spekter Py.

Prostředí	Absorpce			Emise
	λ_{\max} [nm]	A_{\max}	$\epsilon_{\max} \cdot 10^3$ [L mol ⁻¹ cm ⁻²]	1:3
methanol	334	1,168	46,7	1,00
1-propanol	335	1,231	49,2	1,01
chloroform	338	1,180	47,2	1,11
cyklohexan	336	1,412	56,5	0,47
n-heptan	335	1,397	55,9	0,47

4.2 Solubilizační schopnosti modelového systému dodecylsíranu sodného (SDS)

Nyní bylo u zvolených látek charakterizováno jejich chování v různě polárních prostředích a také bylo ověřováno, zda nedochází k jejich rozpouštění v prostředí vody, 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl. Další experimenty proto mohly být zaměřeny na to, jak se tyto látky chovají v modelovém systému SDS v prostředí vody, 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl. Tento modelový systém micel tenzidu SDS byl zvolený proto, protože se jedná o jednoduchý tenzid, který formuje unimolární micely a hodnoty CMC a N_{agg} ve zvolených prostředích jsou tabelovány (Tab. I). Cílem experimentů bylo zjistit solubilizační kapacity SOG, SRG a E^α v micelárním systému SDS v prostředí vody, 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl při stavu nasycení micel, kdy nás zajímali zlomové části křivek závislostí absorbancí na koncentraci. Pro přehlednost grafů byly místo koncentrací uváděny jejich logaritmické hodnoty. Solubilizační kapacita S_c byla chápána jako mol solubilizované látky na 1 mol micel a byla počítána dle vzorce:

$$S_c = \frac{V_{\text{látky}} \cdot c_{\text{ZR látky}}}{V_{\text{celk}} \cdot c_{\text{micel}}}, \quad (11)$$

kde $V_{\text{látky}}$ je objem přidávaného solubilizátu o koncentraci zásobního roztoku $c_{\text{ZR látky}}$, V_{celk} je celkový objem vzorku a c_{micel} je koncentrace micel v celkovém objemu vzorku.

Tímto způsobem vyjádřené hodnoty solubilizačních kapacit z experimentů nemusí odpovídat reálným hodnotám, jelikož je solubilizační kapacita vztažena na agregační číslo, které bylo tabelováno pro „prázdnou“ micelu. Definice solubilizační kapacity by měla spíše odpovídat mol solubilizované látky na 1 mol vložených micel, jelikož solubilizované látky mohou ovlivnit formaci micel. Reálnými hodnotami jsou myšleny hodnoty popisující interagující systém micel, rozpouštědla a solubilizované látky.

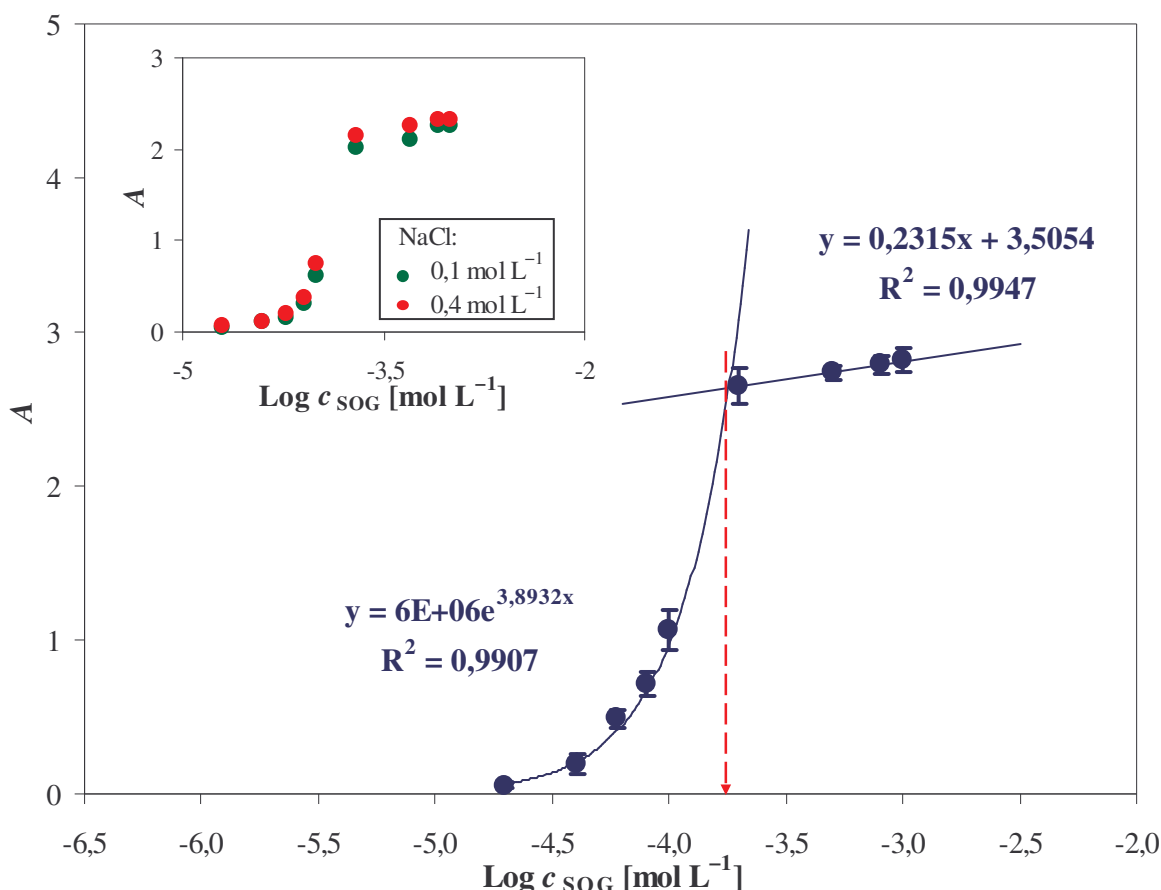
4.2.1 Solubilizace Sudan Orange G v micelárním systému SDS

Byla měřena absorpční spektra roztoků proměnné koncentrace SOG v micelárním systému SDS s konstantní hodnotou koncentrace micel $1 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ v prostředí vody, 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl. Hodnoty absorbancí byly odečítány v maximu, které odpovídalo vlnové délce 381 nm. Jelikož v těchto prostředích dochází k částečnému rozpouštění SOG, byla současně měřena řada SOG pouze v těchto prostředích bez přídavku SDS, která byla při vyhodnocování odečtena od řad SOG v micelárním systému SDS. Měření bylo třikrát opakováno. Podstatou experimentu bylo najít pro všechna prostředí v závislostech absorbancí na koncentrací SOG zlom odpovídající nasycení micel. Při vyhodnocování bylo postupováno

tak, že byla vytvořena závislost absorbance na koncentraci SOG odpovídající průměrné hodnotě tří naměřených řad (Obr. 38). Tato závislost by měla mít v ideálním případě dvě části. První část by měla odpovídat lineárnímu nárůstu absorbance v závislosti na přidávaném množství SOG do micelárního systému SDS z důvodu začleňování molekul SOG do micel. Druhá část by měla odpovídat stavu nasycení micel SOG, kdy již nedochází k nárůstu absorbance v závislosti na přidávaném množství. Průsečík těchto dvou lineárních závislostí by měl odpovídat logaritmické hodnotě koncentrace SOG, která přísluší solubilizační kapacitě micel SDS v daném prostředí pro solubilizovanou látku SOG. V našem reálném případě nedocházelo k lineárnímu nárůstu absorbance v závislosti na přidávaném množství SOG. Tato závislost odpovídala spíše exponenciálnímu průběhu ($R^2_{\text{LIN}} = 0,8779$, $R^2_{\text{EXP}} = 0,9907$), proto k proložení první části závislosti byla volena exponenciální křivka. Druhá část již byla proložena lineární závislostí. Ačkoli vykazovala mírný rostoucí lineární trend, považovali jsme jej za nerostoucí. Z průsečíků těchto křivek byla získané koncentrace SOG, které odpovídají koncentracím uvnitř micel ve stavu nasycení. Tyto hodnoty jednotlivých koncentrací byly poděleny koncentrací micel přítomných daném v systému SDS. Tím byly získány příslušné hodnoty solubilizačních kapacit, které jsou uvedeny v tabulce (Tab. IX). Z hodnot solubilizačních kapacit si můžeme všimnout, že s rostoucí hodnotou iontové síly dochází k nárůstu solubilizační kapacity, což odpovídá teorii v literatuře [1]. Bylo provedeno proložení křivky Boltzmannovou S-křivkou. Hodnoty S_c získané z tohoto proložení byly o něco větší. V případě solubilizace ve vodě hodnota solubilizační kapacity odpovídala 1,93. Avšak k vyhodnocení bylo zvoleno proložení první části exponenciální a druhou částí lineární křivkou z důvodu přiblížení k ideálnímu průběhu závislosti.

Tab. IX Hodnoty koncentrací SOG uvnitř micel v systému SDS v prostředí o různé iontové síle ve stavu nasycení a odpovídající hodnoty koncentrací solubilizačních kapacit pro SOG v micelárním systému SDS ($c_{\text{micel}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

Prostředí	$c_{\text{SOG}} \cdot 10^4 [\text{mol L}^{-1}]$	S_c
SDS ve vodě	1,799	1,80
SDS v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$	1,871	1,87
SDS v $0,4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$	2,046	2,05



Obr. 38 Závislost maxima absorbance (381 nm) na logaritmické hodnotě koncentrace SOG v micelárním systému SDS s konstantní hodnotou koncentrace micel $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ v prostředí vody. Zobrazená křivka odpovídá průměrným hodnotám tří měření. Z velikostí chybových úsečků si můžeme všimnout, že největší odchylky hodnot maxim absorbací odpovídají oblasti nasycení micel SOG. V grafu je naznačena hledaná hodnota koncentrace SOG v micelách ve stavu nasycení. Ve vloženém grafu jsou závislosti pro prostředí 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl.

4.2.2 Solubilizace Sudan Red G v micelárním systému SDS

Byla měřena absorpční spektra roztoků proměnné koncentrace SRG v micelárním systému SDS s konstantní hodnotou koncentrace micel $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ v prostředí vody, 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl. Hodnoty absorbancí byly odečítány v maximu, které odpovídalo vlnové délce 510 nm. Měření bylo třikrát opakováno. Podstata experimentu byla stejná jako v případě solubilizace SOG v micelárním systému SDS a to najít pro všechna prostředí v závislostech zlom odpovídající nasycení micel. Proto bylo při vyhodnocování postupováno stejně jako v případě solubilizace SOG. Výsledky měření nejsou uvedeny graficky, ale tabulkově (Tab. X). I když měření bylo třikrát opakováno, z hodnot směrodatných odchylek je patrné, že pro správnější stanovení S_c by bylo nutné měření ještě několikrát zopakovat. Hodnoty směrodatných odchylek mají nejvyšší hodnoty v oblasti koncentrací odpovídajících nasycení micel, což vypovídá o tom, že k nasycení nedochází při konkrétní hodnotě ale v malém intervalu hodnot koncentrací, což odpovídá zlomovému průběhu závislosti. Z hodnot solubilizačních kapacit (Tab. XI) si můžeme všimnout, že s rostoucí hodnotou iontové síly

dochází k nárůstu solubilizační kapacity, což odpovídá teorii v literatuře [1]. Při srovnání hodnot solubilizačních kapacit SRG a SOG vidíme, že solubilizační kapacity pro SRG v daném micelárním systému a v příslušném prostředí jsou vyšší. Může to být způsobeno rozdílnou lipofilností těchto barviv. SRG je ve vodě nerozpustné narozdíl od SOG, která se ve vodě částečně rozpouští. Z toho usuzujeme, že SRG je lipofilnější, proto se více začleňuje do jádra micely a tím má vyšší hodnotu S_c .

Tab. X Průměrné hodnoty maxim absorbancí (510 nm) odpovídající třem měřením a jejich příslušné směrodatné odchylky pro proměnnou koncentraci SRG v micelárním systému SDS v prostředích o různé iontové síle ($c_{\text{micel}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

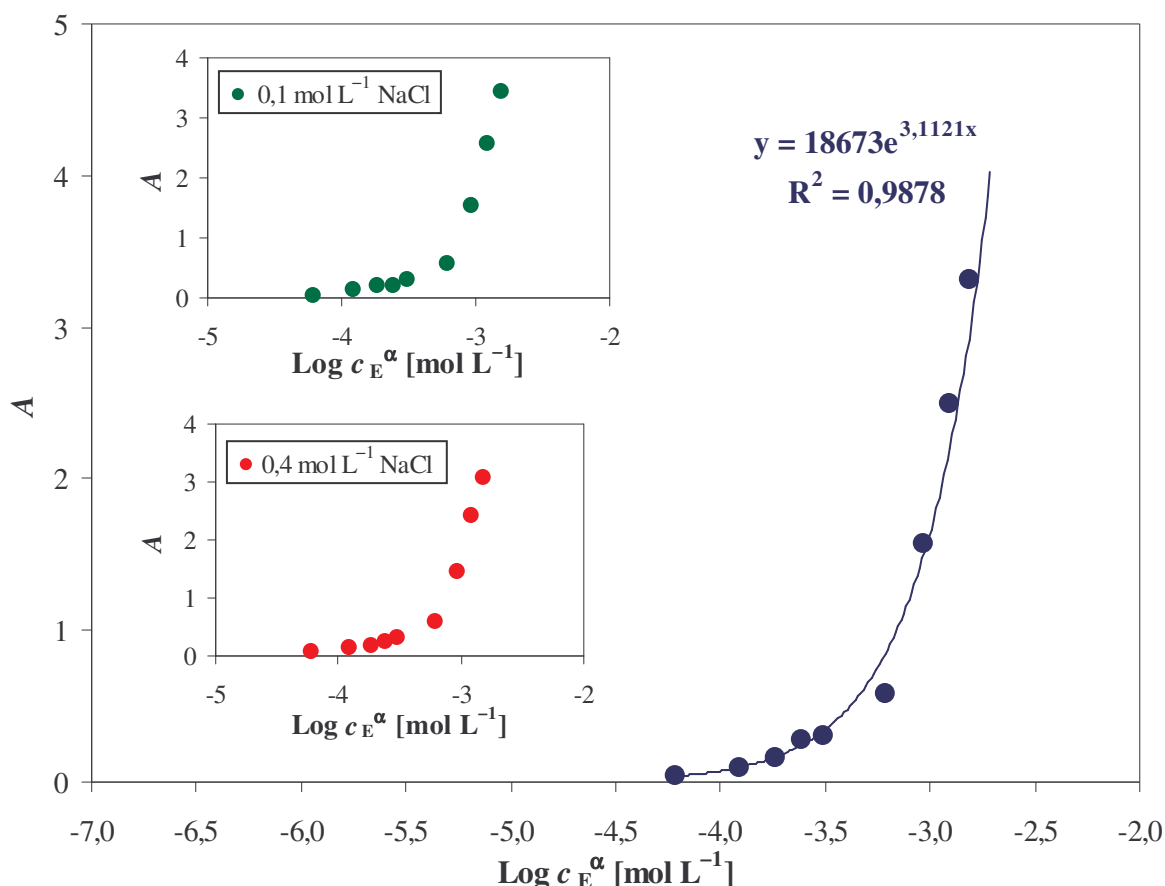
$c_{\text{SRG}} \cdot 10^4$ [mol L ⁻¹]	Voda		0,1 M NaCl		0,4 M NaCl	
	Průměr A	Směrodatná odchylka	Průměr A	Směrodatná odchylka	Průměr A	Směrodatná odchylka
0,2	0,247	0,020	0,290	0,000	0,356	0,013
0,4	0,302	0,024	0,370	0,001	0,537	0,001
0,6	0,350	0,013	0,381	0,028	0,500	0,056
0,8	0,452	0,017	0,489	0,033	0,694	0,010
1,0	0,588	0,005	0,597	0,047	0,727	0,018
2,0	0,712	0,027	0,677	0,067	0,771	0,020
5,0	0,707	0,005	0,805	0,009	0,999	0,008
8,0	0,722	0,002	0,918	0,023	1,026	0,003
10,0	0,740	0,003	0,904	0,021	1,027	0,021

Tab. XI Hodnoty koncentrací SRG uvnitř micel v systému SDS v prostředí o různé iontové síle ve stavu nasycení a odpovídající hodnoty solubilizačních kapacit pro SRG v micelárním systému SDS ($c_{\text{micel}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

Prostředí	$c_{\text{SRG}} \cdot 10^4$ [mol L ⁻¹]	S_c
SDS ve vodě	1,904	1,90
SDS v 0,1 mol L ⁻¹ NaCl	2,188	2,19
SDS v 0,4 mol L ⁻¹ NaCl	2,965	2,97

4.2.3 Solubilizace (±)-α-tokoferolu v micelárním systému SDS

Při měření absorpčního spektra prvotního experimentu s proměnnou koncentrací E^α v micelárním systému SDS v prostředí vody, 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl s konstantní hodnotou koncentrace micel $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, která byla použita pro měření SOG a SRG, byla měřena vysoká absorbance nad hodnotu 3, která nezaručovala správnost výsledku. Jelikož používaný měřicí přístroj neumožňoval měnit citlivost měření, byla zvolena nižší koncentrace micel $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Při snížení koncentrace micel byl předpoklad snížení absorbance z důvodu menší koncentrace E^α v systému. Hodnoty absorbancí byly odečítány v maximu, které odpovídalo vlnové délce 292 nm. Byl předpoklad vzniku nasycení v závislosti absorbance na koncentraci E^α v daném micelárním systému SDS (Obr. 39), jak tomu bylo v případech SOG a SRG, avšak k nasycení nedošlo, i když maximální hodnoty odpovídaly poměrně vysoké hodnotě solubilizační kapacity 20 mol E^α na 1 mol micel.



Obr. 39 Závislost maxima absorbance (292 nm) na logaritmické hodnotě koncentrace E^{α} v micelárním systému SDS s konstantní hodnotou koncentrace micel $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ v prostředí vody. Z průběhu závislosti vidíme, že nedochází k nasycení micel E^{α} jak tomu bylo v případech SOG a SRG.

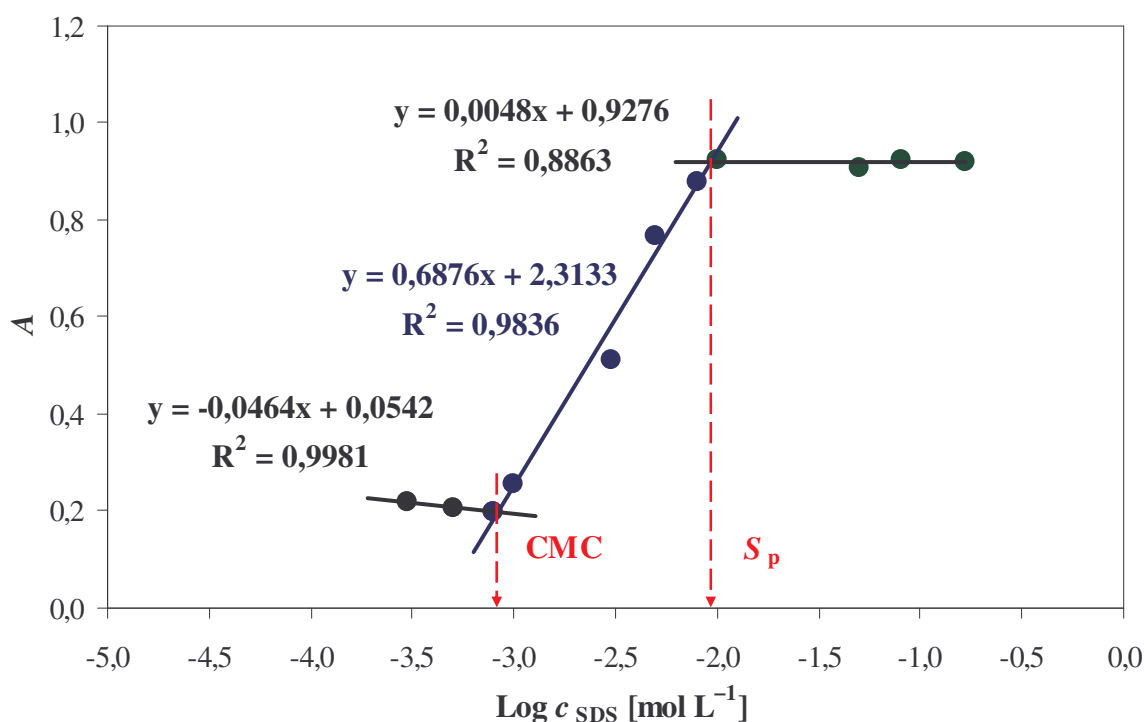
Jelikož nedošlo k nasycení micel, byl zvolen další typ experimentu, kdy místo proměnné koncentrace solubilizované látky v systému s konstantní hodnotou koncentrace micel byly pro měření připravovány vzorky s konstantní koncentrací solubilizované látky a proměnnou koncentrací SDS, což vedlo k určování obecnější hodnoty popisující stupeň solubilizace. Tato hodnota se nazývá solubilizační síla a je vyjádřena jako mol solubilizované látky na 1 mol tenzidu. Naší hledanou závislostí byla opět závislost absorbance na koncentraci SDS. V ideálním případě má tato křivka tři části, které od sebe oddělují dva zlomy. První část odpovídá systému SDS pod kritickou micelární koncentrací, proto velikost absorbance je nulová. Musíme si uvědomit, že se jedná o solubilizaci hydrofóbní látky v ideálním případě. V reálném případě absorbance pod kritickou micelární koncentrací nebude nulová, ale bude se k nulové hodnotě blížit. S rostoucí koncentrací tenzidu dostaneme při určité koncentraci první zlom, který odpovídá CMC. Nyní absorbance lineárně roste v závislosti na rostoucí koncentraci micel, které poskytují volné místo pro solubilizaci hydrofóbní látky uvnitř jejich micelárního jádra. Při určité koncentraci dostaneme druhý zlom, který odpovídá solubilizační síle ve stavu nasycení systému pro danou koncentraci látky. Pokud bychom měli jinou koncentraci látky, k nasycení by nedošlo při stejné koncentraci tenzidu. V případě vyšší koncentrace látky by k nasycení došlo při vyšších hodnotách absorbancí odpovídajícím vyšším hodnotám koncentrací tenzidu, protože by bylo k dispozici větší množství

solubilizované látky. Závislost by zůstala stejná pouze po první zlom, čili hodnotu CMC. Po dosažení nasycení s další rostoucí koncentrací tenzidu nedochází k nárůstu absorpce. Hodnota absorpce je již konstantní.

Byla měřena absorpční spektra roztoků s konstantní koncentrací E^α $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a proměnnou hodnotou koncentrace SDS v prostředí vody, 0,1 a 0,4 mol L^{-1} NaCl. Koncentrace E^α byla volena z výsledků měření v micelárním systému SDS po zjištění příslušných molárních extinkčních koeficientů tak, aby odpovídala absorpanci 1. Hodnoty absorpance byly odečítány v maximu, které odpovídalo vlnové délce 292 nm. Z odečtených hodnot byly sestrojeny závislosti absorpance na koncentraci SDS v daných prostředích. Závislosti měly opravdu tři části, které od sebe oddělovaly dva zlomy, jak už bylo popsáno v ideálním případě. Závislosti byly proloženy přímkami (Obr. 40). Byly odečteny hodnoty logaritmu koncentrací odpovídající průsečíkům přímk a následně přepočteny na koncentrace odpovídající CMC a hodnoty odpovídající solubilizační síle, která byla vyjádřena pomocí vzorce:

$$S_p = \frac{V_{\text{látky}} \cdot c_{\text{ZR látky}}}{V_{\text{celk}} \cdot c_{\text{tenzidu}}}, \quad (12)$$

kde $V_{\text{látky}}$ je objem přidávaného solubilizátu – E^α o koncentraci zásobního roztoku $c_{\text{ZR látky}}$, V_{celk} je celkový objem vzorku a c_{tenzidu} je koncentrace tenzidu při stavu nasycení odpovídající danému množství solubilizované látky ve vzorku.



Obr. 40 Závislost maxima absorpance (292 nm) na logaritmické hodnotě koncentrace SDS systému s konstantní koncentrací E^α $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ v prostředí 0,1 mol L^{-1} NaCl. Tuto závislost tvoří tři lineární části, které jsou proloženy lineární směnicí trendu. Průsečíky těchto lineárních částí odpovídají logaritmu CMC a logaritmické hodnotě koncentrace SDS odpovídající S_p .

Při srovnání experimentálně získaných hodnot CMC pro SDS v prostředí vody, 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl (Tab. XII) s příslušnými tabelovanými hodnotami (Tab. I) bylo zjištěno, že tabelované hodnoty CMC pro SDS se od naměřených hodnot liší. Hodnota CMC v prostředí vody je řádově nižší a hodnoty CMC v prostředí 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl jsou srovnatelné. Důvod nízké CMC v prostředí vody může být ten, že E^α může působit jako kosurfaktant, což bylo usouzeno z jeho struktury (tenzidový charakter). Hodnoty solubilizační síly s rostoucí iontovou silou klesají. Příslušné hodnoty solubilizační kapacity nejsou uvedeny, z důvodu vlivu E^α na hodnotu CMC. Byla zvážena možnost proložení závislosti Boltzmannovou S-křivkou. Hledané hodnoty S_p získané z tohoto proložení byly srovnatelné s hodnotami získanými jako průsečíky přímek. Lišili se v tisícinách, proto bylo zvoleno jedno vyhodnocení a to pomocí proložení tří lineárních částí.

Tab. XII Hodnoty CMC a S_p pro systém o proměnné koncentraci SDS v prostředí o různé iontové síle s konstantní koncentrací E^α 3 · 10⁻⁴ mol L⁻¹.

Prostředí	CMC · 10 ⁻⁴ [mol L ⁻¹]	S _p
SDS ve vodě	3,71	0,05
SDS v 0,1 mol L ⁻¹ NaCl	8,32	0,03
SDS v 0,4 mol L ⁻¹ NaCl	6,93	0,02

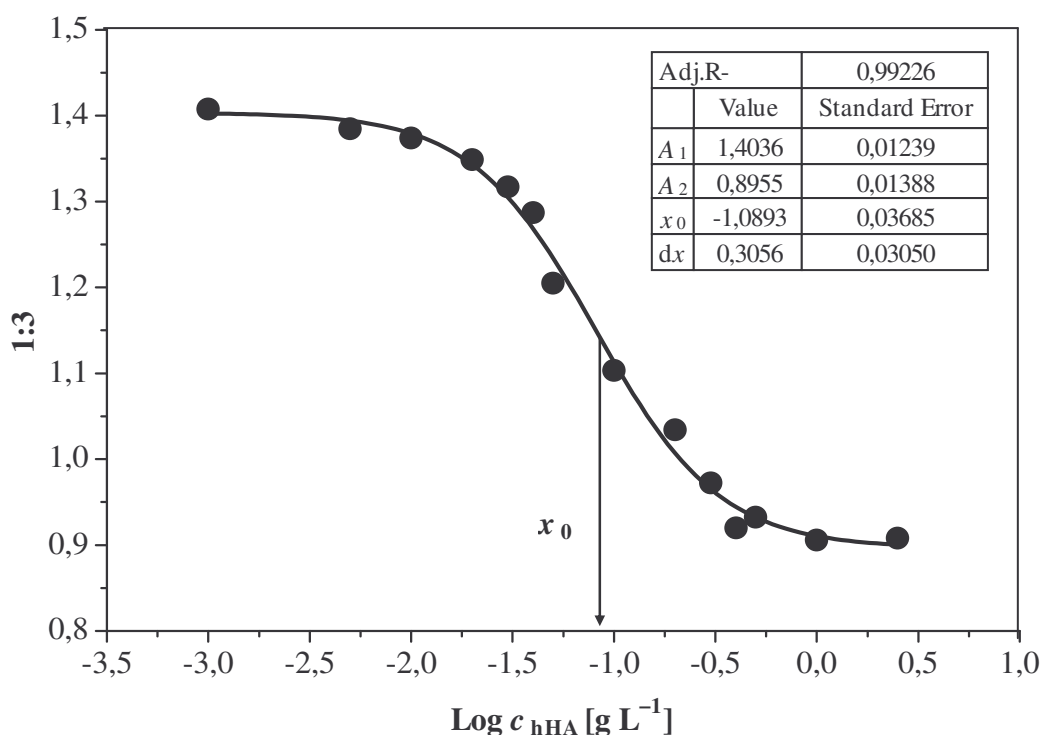
4.3 Solubilizační schopnosti alkylových derivátů HA (hHA)

U zvolených látek bylo charakterizováno jejich chování v různě polárních prostředích a také bylo ověřováno, zda nedochází k jejich rozpouštění v prostředí vody, 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl. Dále byla prozkoumána jejich schopnost solubilizovat se do jednoduchých micel modelového systému SDS v prostředích s různou iontovou silou (voda, 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl). Nyní bylo přistoupeno k solubilizačním schopnostem alkylových derivátů hyaluronanu, které představují skupinu polymerní micel. Jedná se o hydrofobizované deriváty, proto je budeme označovat jako hHA. Pro naše experimenty byly zvoleny tři alkylové deriváty značené pracovním názvem DEC-NH-HA. To znamená, že je na molekuli HA navázaný decyl přes karbamátovou vazbu (Obr. 9). Tyto deriváty měly stejnou molekulovou hmotnost 100 kDa (kg mol⁻¹), avšak lišily se stupněm substituce (10, 30, 50), který vyjadřuje počet alkylových jednotek připadajících na jeden dimer HA. V případě derivátu DEC-NH-HA 100/10 to znamená, že 0,1 decylových jednotek připadá na jeden dimer HA.

4.3.1 Určení kritické asociační koncentrace hHA pomocí pyrenu

Dříve, než se bylo možné zaměřit na solubilizační schopnosti zvolených hHA, bylo nutné zjistit jejich CAC. Pro experiment byly vytvořeny koncentrační řady všech tří hHA ve zvolených prostředích o různé iontové síle naředěním již ustálených koncentrovaných zásobních roztoků, které obsahovaly konstantní koncentraci Py 2,5 · 10⁻⁵ mol L⁻¹. Byla měřená jejich emisní spektra. Vyhodnocování bylo provedeno podle metody poměru 1:3, která je popsána v části 2.7.3.3 Pyren, v programu OriginPro 8, který v nabídce analýz obsahuje proložení závislosti Boltzmannovou S-křivkou (Obr. 41). Tato funkce proložení vytvoří tabulku s hodnotami charakterizující Boltzmannovu S-křivku, které je možno použít při výpočtu hodnot na ose y dle vzorce (9). Metoda poměru 1:3 nabízí pro stanovení CAC tři

možné body. Pro hHA bylo zjištěno pomocí intenzity fluorescence perylenu, že hledaná hodnota CAC odpovídá inflexnímu bobu křivky [34], čili bodu x_0 . Při odečítání logaritmu CAC bylo postupováno tak, že každá závislost poměru 1:3 na koncentraci byla proložena Boltzmannovou S-křivkou a tím byly získány přesné hodnoty inflexního bodu, které po odlogaritmování odpovídali CAC příslušné hHA v daném prostředí (Tab. XIII). Z jednotlivých hodnot CAC vidíme, že s rostoucí iontovou silou roste hydrofóbnost domén a tím i hodnota CAC u všech hHA, což odpovídá teorii psané v literatuře [1]. Pro naše zvolené deriváty platí, že vyšší hodnoty CAC má hHA s nižším stupněm substituce.



Obr. 41 Závislost poměru intenzit pyrenu 1:3 na logaritmické hodnotě koncentrace DEC-NH-HA 100/50 v prostředí $0,4 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$, která je proložena Boltzmannovou S-křivkou. V tomto grafu je vložena tabulka popisující S-křivku, která je vygenerovaná programem OriginPro 8 po proložení závislosti. Z pravdivostní hodnoty vidíme, že toto měření má vysokou pravdivostní hodnotu, proto získaná hodnota CAC bude z velké pravděpodobnosti odpovídat ideální hodnotě.

Tab. XIII Hodnoty CAC pro zvolené hHA v prostředích s různou iontovou silou získané ze závislosti poměru 1:3 na logaritmické hodnotě koncentrace příslušného derivátu odpovídající hodnotám inflexního bodu Boltzmannovy S-křivky.

Prostředí	CAC [g L^{-1}]		
	DEC-NH-HA	DEC-NH-HA	DEC-NH-HA
	100/10	100/30	100/50
hHA ve vodě	0,380	0,138	0,122
hHA v $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$	0,350	0,111	0,095
hHA v $0,4 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$	0,305	0,097	0,081

4.3.2 Vliv koncentrace pyrenu na polaritu domén hHA

Pro experiment byly vytvořeny koncentrační řady všech tří hHA ve zvolených prostředích o různé iontové síle naředěním již ustálených koncentrovaných zásobních roztoků, které obsahovaly proměnnou koncentraci Py. Pro každý derivát byly vytvořeny dvě řady koncentrací odpovídající různé polaritě hydrofóbních domén. První řada odpovídala koncentraci $CAC + 10\%$ z její hodnoty a druhá řada koncentraci $0,5 \text{ g L}^{-1}$. Tyto koncentrace byly zvoleny proto, aby byla prozkoumána polarita domén hHA v oblasti koncentrace vzniku micel a koncentrace odpovídající nejvyšší možné hodnotě lineární části Boltzmannovy S-křivky, kdy roztoky hHA nebyly ještě zakalené z důvodu jejich vysoké koncentrace. Podstatou experimentu bylo zjistit, zda koncentrace Py ovlivňuje polaritu domén hHA při zvolených koncentracích. Ze závislosti polaritního indexu (poměru 1:3) na logaritmické hodnotě koncentrace Py bylo zjištěno, že koncentrace Py ovlivňuje polaritu domén hHA, avšak existují oblasti koncentrací Py odpovídající stabilním hodnotám polaritních indexů (Tab. XIV). Experiment byl proto zaměřen na stanovení nejvyšší koncentrace Py pro danou koncentraci daného hHA odpovídající ještě stabilní oblasti závislosti polaritního indexu na logaritmické hodnotě koncentrace Py. Stanovení této koncentrace Py, která neovlivňuje polaritu domén hHA, nebylo možné vždy určit ze závislosti poměru 1:3 na logaritmické hodnotě koncentrace Py, protože vždy nedocházelo ke vzniku stabilních oblastí. V těchto případech byla hledaná koncentrace Py stanovena ze závislosti poměru intenzity fluorescence excimeru a monomeru (E:M) na logaritmické hodnotě koncentrace Py. Koncentrace Py, která neovlivňuje polaritu domén hHA, byla brána jako hodnota koncentrace, která odpovídala minimální hodnotě poměru E:M, protože tato hodnota charakterizuje minimální množství Py v systému a tím i minimální vliv koncentrace Py na polaritu domén. V tabulce (Tab. XIV) jsou uvedeny hodnoty poměrů 1:3 a E:M pro všechny hHA v prostředí vody, 0,1 a $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl. Stanovená koncentrace Py, která ještě neovlivňuje hodnotu polarity domén hHA, je pro všechny hHA a všechny prostředí stejná, odpovídá hodnotě $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

4.3.3 Vliv doby na polaritu domén hHA

Pro experiment byly v dostatečném množství připraveny zásobní roztoky hHA v prostředí vody, 0,1 a $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl o koncentraci $CAC + 10\%$, které byly postupně odebírány v časovém intervalu 0, 24, 48 a 72 h od doby přípravy zásobních roztoků. Pro každý derivát a pro každé prostředí byly odebírány tři vzorky, které obsahovaly konstantní množství Py o koncentraci $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ která, jak už bylo zjištěno, nemá vliv na polaritu domén hHA. Byla proměřována emisní spektra. Z hodnot poměrů 1:3 byl sledován vliv doby odběru na polaritu domén hHA (Tab. XV). Bylo zjištěno, že doba odběru nemá žádný vliv na polaritu domén hHA při dané koncentraci pro daný způsob přípravy roztoku hHA. Z toho usuzujeme, že vytvořený systém hydrofóbních domén hHA v daných prostředích pro danou koncentraci je časově stálý.

Tab. XIV Hodnoty polaritního indexu (1:3) a poměru E:M pro tři deriváty hHA o dvou koncentracích pro prostředí o různé iontové síle.

$c_{Py} \cdot 10^6$ [mol L ⁻¹]		hHA ve vodě				hHA v 0,1 M NaCl				hHA v 0,4 M NaCl			
		0,5 g L ⁻¹		CAC + 10 %		0,5 g L ⁻¹		CAC + 10 %		0,5 g L ⁻¹		CAC + 10 %	
		1:3	E:M	1:3	E:M	1:3	E:M	1:3	E:M	1:3	E:M	1:3	E:M
100/10	0,2	0,99	0,06	1,00	0,05	1,03	0,07	1,03	0,07	1,02	0,06	1,06	0,07
	0,4	1,00	0,07	1,02	0,09	1,07	0,08	1,05	0,08	1,04	0,08	1,06	0,08
	0,6	1,03	0,06	1,03	0,09	1,18	0,06	1,14	0,08	1,05	0,09	1,08	0,08
	1,0	1,00	0,12	1,04	0,13	1,04	0,13	1,07	0,14	1,06	0,10	1,16	0,07
	1,4	1,02	0,16	1,05	0,15	1,05	0,14	1,16	0,15	1,06	0,17	1,21	0,25
	6,0	1,10	0,44	1,11	0,40	1,12	0,46	1,17	0,43	1,10	0,39	1,16	0,46
100/30	0,2	0,90	0,06	0,95	0,05	0,93	0,05	0,96	0,05	0,95	0,05	0,97	0,05
	0,4	0,87	0,06	0,96	0,05	0,91	0,05	0,97	0,06	0,93	0,06	0,99	0,07
	0,6	0,87	0,07	0,96	0,06	0,91	0,06	1,00	0,07	0,93	0,06	1,00	0,07
	1,0	0,87	0,09	0,97	0,12	0,90	0,08	1,00	0,10	0,92	0,08	1,02	0,14
	1,4	0,86	0,10	0,97	0,15	0,90	0,11	1,02	0,12	0,92	0,09	1,03	0,17
100/50	0,1	0,98	0,08	1,00	0,05	0,97	0,08	1,02	0,04	0,99	0,07	1,02	0,05
	0,2	0,93	0,06	1,01	0,05	0,95	0,06	1,02	0,05	0,98	0,07	1,02	0,05
	0,4	0,91	0,06	0,99	0,08	0,96	0,06	1,03	0,07	0,97	0,06	1,02	0,07
	0,6	0,93	0,07	1,02	0,11	0,94	0,07	1,03	0,09	0,94	0,06	1,02	0,09
	1,0	0,91	0,09	1,03	0,16	0,94	0,08	1,05	0,14	0,95	0,07	1,03	0,14
	2,0	0,90	0,12	1,04	0,16	0,93	0,09	1,06	0,19	0,94	0,09	1,04	0,19

Tab. XV Hodnoty polaritního indexu (1:3) pro tři deriváty hHA o koncentraci CAC + 10 %, pro prostředí o různé iontové síle v časových intervalech.

	1:3			
100/10	0 hodin	24 hodin	48 hodin	72 hodin
voda	0,95	0,94	0,94	0,95
0,1 mol L ⁻¹ NaCl	1,00	1,03	1,02	1,01
0,4 mol L ⁻¹ NaCl	1,01	1,02	1,02	1,02
100/30	0 hodin	24 hodin	48 hodin	72 hodin
voda	0,93	0,94	0,93	0,93
0,1 mol L ⁻¹ NaCl	0,96	1,00	1,02	1,03
0,4 mol L ⁻¹ NaCl	0,97	0,99	1,00	1,00
100/50	0 hodin	24 hodin	48 hodin	72 hodin
voda	0,93	0,95	0,94	0,94
0,1 mol L ⁻¹ NaCl	0,95	0,97	0,98	0,97
0,4 mol L ⁻¹ NaCl	0,98	0,99	1,01	0,99

4.3.4 Vliv přípravy roztoků hHA na polaritu domén

Srovnáme-li hodnoty poměru 1:3 získané odečtením ze závislosti poměru 1:3 na logaritmické hodnotě koncentrace Py z Boltzmannovy S-křivky pro koncentraci CAC + 10 % z měření při určování CAC, kdy byly tyto roztoky připravovány naředěním z koncentrovanějších zásobních roztoků a s hodnotami poměru 1:3 získané z měření přímo připravených roztoků o koncentraci CAC + 10 % (Tab. XVI), zjistíme, že hodnoty nejsou stejné pro derivát o nejnižším stupni substituce. V případě tohoto derivátu platí, že hydrofobnost domény pro všechna prostředí v případě přípravy naředěním je nižší, než v případě přímé přípravy roztoku o dané koncentraci. Může to být způsobeno tím, že při naředění dochází vlivem přidávaného prostředí k oslabení interakcí držící doménovou strukturu pohromadě a tím klesá kompaktnost vytvořených domén. Pro další dva stupně substituce jsou hodnoty polaritní domén srovnatelné. Tuto odlišnost od derivátu s nejnižším stupněm substituce si vysvětlujeme tím, že přítomnost většího počtu substituentů na řetězci HA umožňujících vytváření domén způsobuje kompaktnější a pevnější domény. Z toho vyplývá, budeme-li chtít pevnější a hydrofóbnější domény, použijeme deriváty s vyšším stupněm substituce.

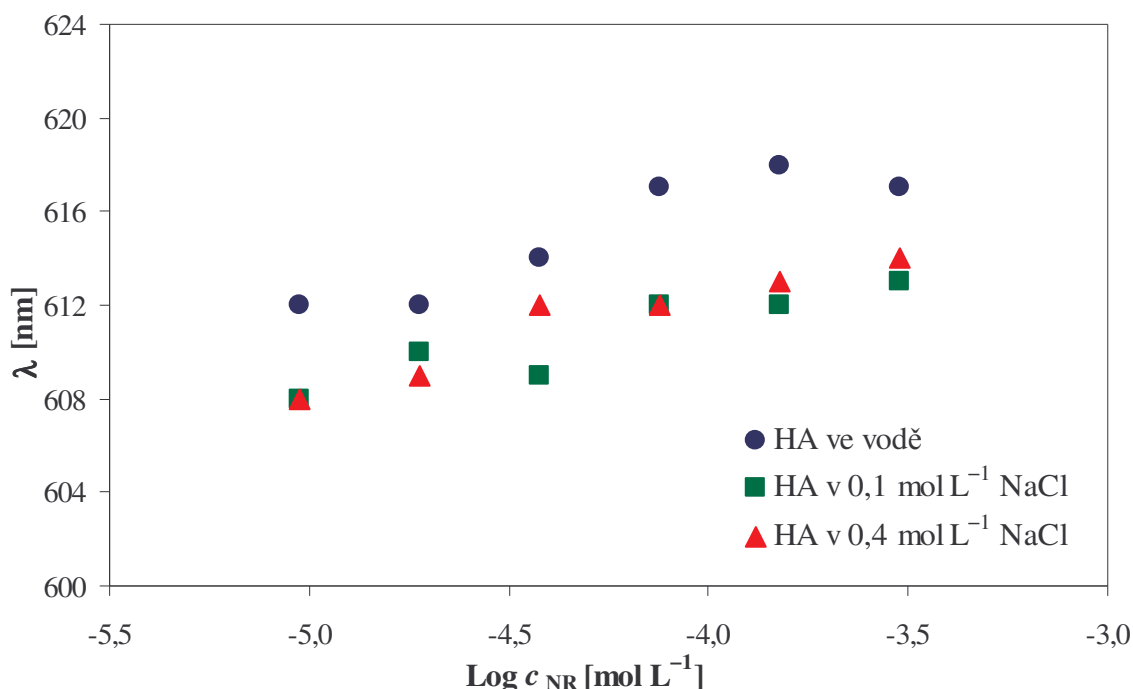
Tab. XVI Hodnoty polaritního indexu (1:3) pro tři deriváty hHA o koncentraci CAC + 10 %, pro prostředí o různé iontové síle pro dva typy způsobu přípravy roztoků (N: naředění, P: přímá příprava).

CAC + 10 %	1:3					
	100/10		100/30		100/50	
Prostředí	N	P	N	P	N	P
voda	1,10	0,95	0,94	0,93	0,93	0,93
0,1 mol L ⁻¹ NaCl	1,07	1,00	0,94	0,96	0,94	0,95
0,4 mol L ⁻¹ NaCl	1,10	1,01	0,95	0,97	0,95	0,98

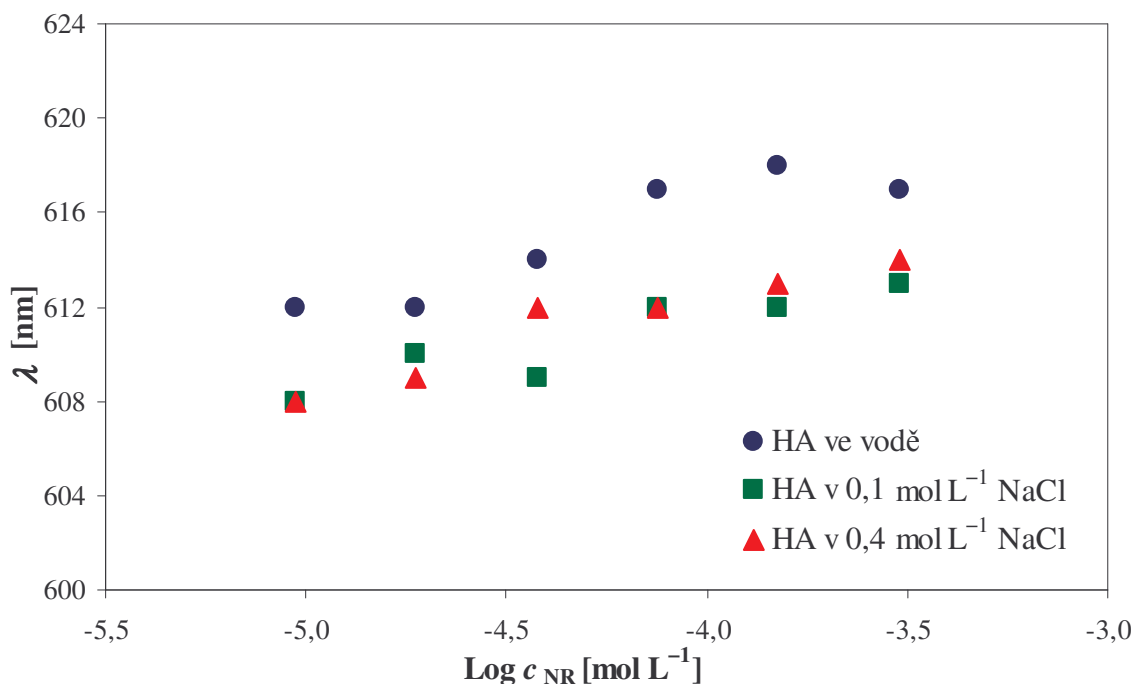
4.3.5 Vliv koncentrace Nílské červeně na polaritu domén hHA

Tento experiment odpovídá experimentu vlivu koncentrace Py na polaritu domén hHA. Nebyla sledována změna poměru intenzit fluorescence jak tomu bylo u Py, ale změna polohy maxim v emisních spektrech. Pro experiment byly vytvořeny koncentrační řady všech tří hHA ve zvolených prostředích o různé iontové síle naředěním již ustálených koncentrovaných zásobních roztoků, které obsahovaly proměnnou koncentraci NR. Pro každý derivát byly vytvořeny dvě řady koncentrací odpovídající různé polaritě hydrofóbních domén. (CAC + 10 % a 0,5 g L⁻¹). Podstatou experimentu bylo zjistit, zda koncentrace NR ovlivňuje polaritu domén hHA. Bylo zjištěno, že ovlivňuje. Z grafu závislosti vlnové délky odpovídající maximu v emisním spektru na koncentraci NR pro koncentraci hHA CAC + 10 % (Obr. 42) a 0,5 g L⁻¹ (Obr. 43) vidíme, že vliv koncentrace NR je výraznější pro koncentraci 0,5 g L⁻¹. NR je polaritní sonda, která reaguje na rostoucí polaritu prostředí bathochromním posunem. V případě vlivu koncentrace NR na polaritu domén hHA to znamená, že s rostoucí koncentrací NR v systému hHA nad CAC polarita domén roste. V případě vyšších koncentrací hHA než odpovídá hodnotám CAC je vliv koncentrace NR větší. Pro náš derivát DEC-NH-HA 100/30 v prostředí vody a určitém rozmezí koncentrací NR o koncentraci CAC + 10 % dochází k změně polaritě v rozmezí 612–618 nm a v prostředí

o koncentraci $0,5 \text{ g L}^{-1}$ v rozmezí 608–619 nm. Z nárůstu polarizace domén způsobeného zvýšením koncentrace NR vyvozujeme, že není jedno, jakou koncentraci NR pro studium polarizace domén hHA použijeme, abychom zamezili vlivu samotné látky NR. Na druhou stranu neumíme určit takovou koncentraci, která by na polaritu domén vliv neměla.



Obr. 42 DEC-NH-HA 100/30. Závislost vlnové délky maxima emisního píku NR na logaritmické hodnotě koncentrace NR v hHA o koncentraci $CAC + 10 \%$ v prostředí vody a $0,1$ a $0,4 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$.



Obr. 43 DEC-NH-HA 100/30. Závislost vlnové délky maxima emisního píku NR na logaritmické hodnotě koncentrace NR v hHA o koncentraci $0,5 \text{ g L}^{-1}$ v prostředí vody a $0,1$ a $0,4 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$.

4.3.6 Solubilizace Sudan Red G v hHA

Pro studium solubilizace SRG hydrofobizovaného derivátu DEC-NH-HA 100/30 v prostředích s různou iontovou silou byla připravena řada vzorků s konstantním množstvím SRG o koncentraci $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Tato koncentrace byla volena z výsledků měření v micelárním systému SDS po zjištění příslušných molárních extinkčních koeficientů tak, aby odpovídala absorbanci 1. Vzorky se od sebe lišili proměnnou koncentrací derivátu HA, která se nacházela v rozsahu koncentrací $0,005\text{--}2,5 \text{ g L}^{-1}$. Koncentrační řada byla připravena naředěním již ustáleného koncentrovaného zásobního roztoku daného hHA. Bylo zjištěno, že k solubilizaci SRG do domén hHA nedochází po případě, že se k solubilizaci dochází velmi málo. Roztoky SRG v hHA byly proto podrobeny 24 hodinové sonifikaci při 50°C . Ani tento způsob přípravy nepodpořil solubilizaci. Z toho bylo usouzeno, že jednou z možností neúspěchu solubilizace SRG je nízká lipofilnost jádra domény hHA, která není pro SRG dostatečně velká, aby umožnila přesun SRG do domény hHA. Popřípadě k solubilizaci SRG nedochází z důvodů stérických efektů.

4.3.7 Solubilizace (\pm)- α -tokoferolu v hHA

Pro studium solubilizace E^α v hydrofobizovaném derivátu DEC-NH-HA 100/30 v prostředích o různé iontové síle byla připravena řada vzorků s konstantním množstvím E^α o koncentraci $2,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Tato koncentrace byla volena z výsledků měření v micelárním systému SDS po zjištění příslušných molárních extinkčních koeficientů tak, aby odpovídala absorbanci 1. Vzorky se od sebe lišili proměnnou koncentrací derivátu HA, která se nacházela v rozsahu koncentrací $0,005\text{--}2,5 \text{ g L}^{-1}$. Koncentrační řada byla připravena naředěním již ustáleného koncentrovaného zásobního roztoku daného hHA. Byla proměřena absorbance koncentračních řad, avšak tyto koncentrační řady nebylo možné vyhodnotit, protože při vyšších koncentracích hHA, kde jsme předpokládali nasycení micel, vznikl zákal, který clonil absorpci E^α . Příslušné blanky byly nezakalené. Měření emisních spekter nebylo provedeno z důvodu vzniklého zákalu, který by měl vliv na měřenou intenzitu fluorescence.

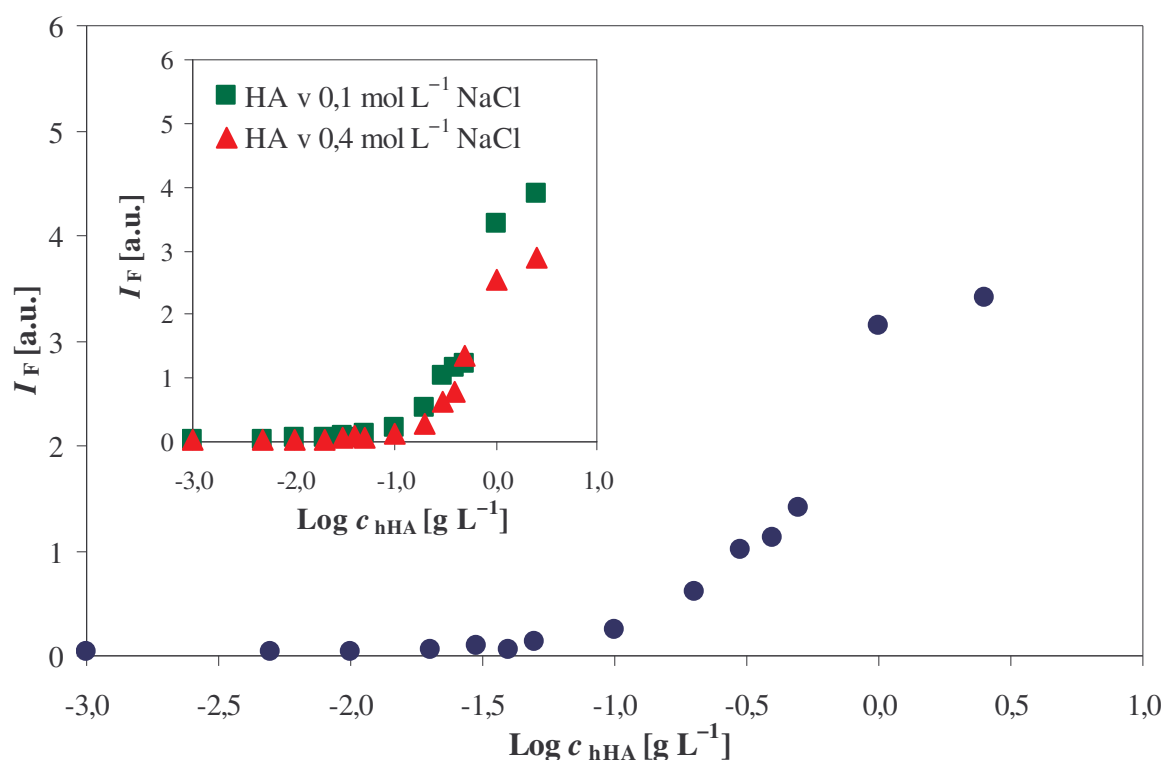
4.3.8 Solubilizace perylenu v hHA

Pro studium solubilizace Pe v hydrofobizovaných derivátech hyalurovanu v prostředích o různé iontové síle byla připravena řada vzorků s konstantním množstvím Pe o koncentraci $2,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Tato koncentrace byla volena z výsledků měření v micelárním systému SDS po zjištění příslušných molárních extinkčních koeficientů tak, aby odpovídala absorbanci 1. Byla proměřena absorbance koncentračních řad, avšak tyto koncentrační řady nebylo možné vyhodnotit, protože při vyšších koncentracích hHA, kde bylo předpokládáno nasycení micel docházelo k clonění absorpce Pe, ačkoli tyto roztoky byly čiré. Proto byly proměřeny jejich emisní spektra. V závislostech maxim intenzit fluorescence na logaritmické hodnotě koncentrace hHA byl náznak nasycení (Obr. 44), (Obr. 45), (Obr. 46). I když křivka neobsahovala dostatečné množství bodů v oblasti nasycení, byly tyto křivky proloženy v programu OriginPro 8 Boltzmannovou S-křivkou. Byly získány hodnoty, které tuto křivku charakterizují. K odečtení hodnot logaritmu koncentrací hHA odpovídající nasycení domén danou koncentrací Pe byla proložena lineární část křivky a hodnota odpovídající maximu, která byla získána z programu OriginPro 8. Hledaná hodnota odpovídala jejich průsečíku. Z těchto hodnot byly podle výrazu (12) dopočítány příslušné solubilizační síly, které vyjadřují mol Pe na 1 mol příslušného hHA. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce (Tab. XVII). Z těchto hodnot můžeme vidět, že pro derivát s nejvyšším stupněm substituce platí, že při rostoucí

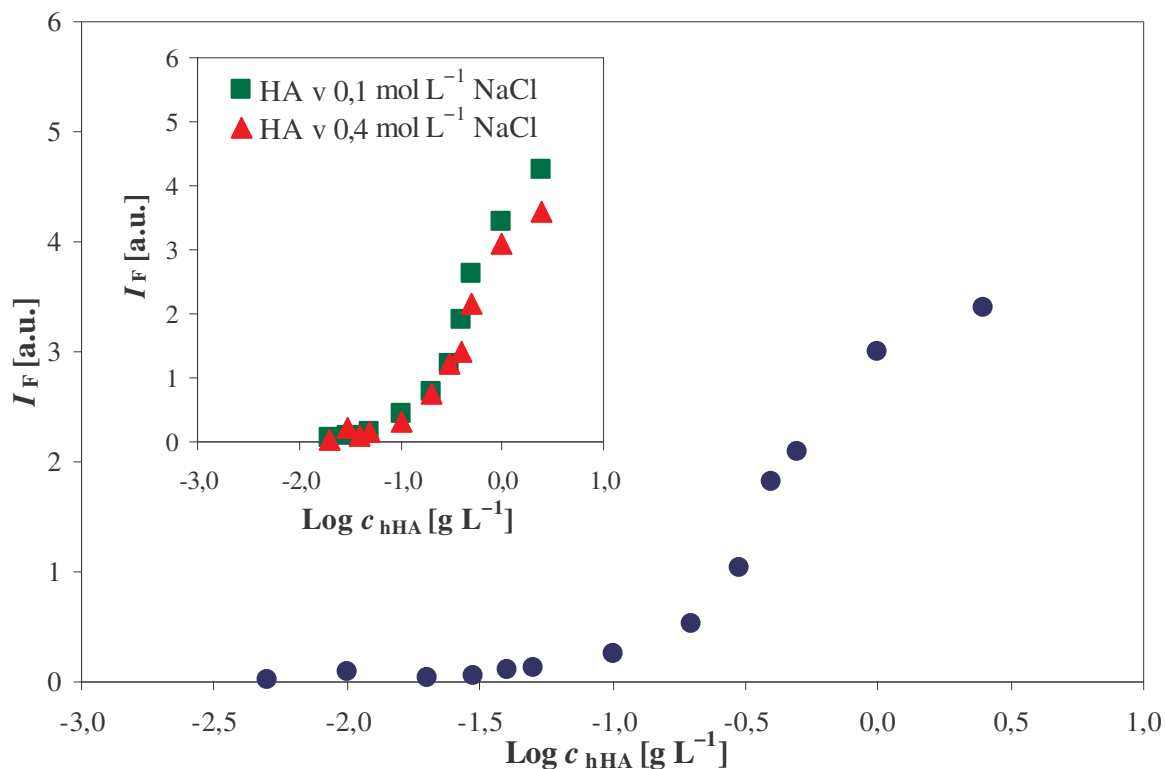
iontové síle roste solubilizační síla a s ní množství solubilizované látky v hydrofóbních doménách. Tento vliv iontové síly na rostoucí solubilizační sílu odpovídá vlivu v klasických micelárních systémech. V případech s nižším stupněm substituce je to jiné. V případě derivátu se středním stupněm substituce je vliv iontové síly opačný, to znamená, že s rostoucí iontovou silou klesá solubilizační síla. Nejkomplikovanější je to u derivátu s nejnižším stupněm substituce. Vliv iontové síly se prokázal, avšak nebylo objeveno pravidlo, jakým způsobem k vlivu dochází. Důvod, proč jsme neměřili závislost při vyšších koncentracích, abychom získali dostatečné množství hodnot v oblasti nasycení a tím přesnější výsledky byl ten, že roztoky hHA těchto koncentrací jsou již zakalené.

Tab. XVII Hodnoty S_p pro systém o proměnné koncentraci hHA v prostředí o různé iontové síle s konstantní koncentrací $Pe\ 2,2 \cdot 10^{-5}\ \text{mol L}^{-1}$.

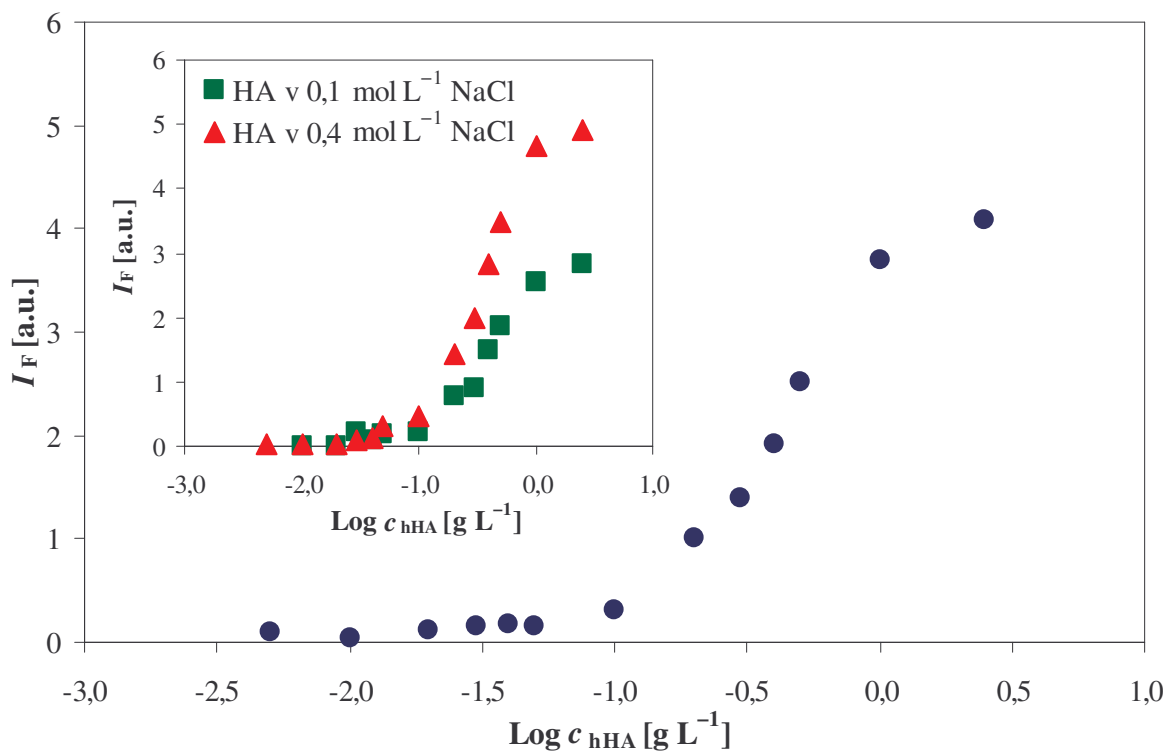
Prostředí	$S_p \cdot 10^3$		
	100/10	100/30	100/50
voda	8,0	3,5	6,7
0,1 mol L ⁻¹ NaCl	1,3	7,0	6,3
0,4 mol L ⁻¹ NaCl	4,5	7,5	5,6



Obr. 44 DEC-NH-HA 100/10. Závislost intenzity fluorescence na logaritické hodnotě koncentrace hHA v systému s konstantním množstvím Pe o koncentraci $2,2 \cdot 10^{-5}\ \text{mol L}^{-1}$ v prostředí vody a 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl.



Obr. 45 DEC-NH-HA 100/30. Závislost intenzity fluorescence na logaritmické hodnotě koncentrace hHA v systému s konstantním množstvím Pe o koncentraci $2,2 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ v prostředí vody a 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl.



Obr. 46 DEC-NH-HA 100/50. Závislost intenzity fluorescence na logaritmické hodnotě koncentrace hHA v systému s konstantním množstvím Pe o koncentraci $2,2 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ v prostředí vody a 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl.

5 ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byla provedena literární rešerše na téma solubilizace ve vodném prostředí se zaměřením na hydrofóbní soluty, které bylo rozšířeno o témata s ním související. V experimentální části bylo provedeno samotné studium solubilizačních vlastností. Vyhodnoceno bylo hlavně z hlediska stupně (úrovně) solubilizace a ne z hlediska optimalizace přípravy roztoku, jak bylo dáno zadáním diplomové práce. Tato změna ve vyhodnocování byla způsobena zjištěnými vlivy na stupeň solubilizace v průběhu měření. Cílem práce bylo prozkoumat solubilizační schopnosti polysacharidů, které byly zastoupeny alkylovými deriváty hyaluronanu. Obecně deriváty hyaluronanu ve vodném prostředí vytvářejí hydrofóbní domény, které byly středem zájmu experimentů. Pro studium těchto hydrofóbních domén ve vodném prostředí byly použity látky Sudan Red G, (\pm)- α -tokoferol, Nílská červeň, perylen a pyren.

Nejdříve byly zvolené látky podrobené studiu jejich chování v prostředích o různé iontové síle (vody, 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl), které byly zvoleny pro solubilizační experimenty, a v různě polárních prostředích (methanol, 1-propanol, chloroform, cyklohexan a n-heptan) k ověření chování některých látek, které jsou uváděny jako polaritní sondy. Z absorpčních měření bylo zjištěno, že SOG se ve zvolených prostředích pro solubilizaci nepatrně rozpouští. Látky SRG, E ^{α} , NR, Pe a Py jsou vhodné pro studium hydrofóbních oblastí domén.

Na modelovém systému dodecylsírany sodného byla studována úroveň solubilizace, která byla vyjádřena solubilizační kapacitou a obecnější solubilizační silou. Solubilizace SOG byla prozkoumána s ohledem na jeho částečnou rozpustnost v prostředí vody, 0,1 a 0,4 mol L⁻¹ NaCl. Byla zjištěna závislost rostoucí iontové síly na rostoucí solubilizační kapacitu. Hodnoty solubilizačních kapacit SOG byly stanoveny na 1,80 ve vodě, 1,87 v 0,1 mol L⁻¹ NaCl a 2,05 v 0,4 mol L⁻¹ NaCl. Závislost rostoucí iontové síly na rostoucí solubilizační kapacitu byla prokázána i u SRG. Jednotlivé hodnoty solubilizačních kapacit SRG byly stanoveny na 1,90 ve vodě, 2,19 v 0,1 mol L⁻¹ NaCl a 2,97 v 0,4 mol L⁻¹ NaCl. U solubilizace E ^{α} bylo voleno vyjádření úrovně solubilizace pomocí solubilizační síly z důvodu nenasycení micel u prvotního způsobu vyjadřování. Solubilizační síla pro koncentraci $3 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ E ^{α} byla stanovena na 0,05 ve vodě, 0,03 v 0,1 mol L⁻¹ NaCl a 0,02 v 0,4 mol L⁻¹ NaCl. S rostoucí iontovou silou klesá hodnota solubilizační síly pro koncentraci $3 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ E ^{α} .

Dříve než byly provedeny solubilizační experimenty alkylových derivátů HA (DEC-NH-HA 100/10, DEC-NH-HA 100/30 a DEC-NH-HA 100/50), byly stanoveny jejich kritické asociační koncentrace pomocí pyrenu a jeho metody poměru 1:3. Obecně platí, že s rostoucí iontovou silou a rostoucím stupněm substituce klesá hodnota CAC. Byl zkoumán vliv koncentrace Py na polaritu domén hHA. Koncentrace Py má vliv na polaritu domén, avšak byla stanovena koncentrace $4 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹ Py pro všechny deriváty ve zvolených prostředích, která polaritu ještě neovlivňuje. Vliv koncentrace solubilizované látky na polaritu domén byl prokázán také u NR. V případě přímo připravených roztoků hHA při solubilizaci Py o koncentraci $4 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹ byla objevena nezávislost polarity domén na dobu stabilizace roztoků po dobu 72 hodin. Srovnáním hodnot vyjadřující polaritu domén u přímo připravených roztoků a roztoků připravených naředěním byl zjištěn vliv u nejméně substituovaného derivátu. Polarita domén byla vyšší roztoků připravených naředěním. Hodnoty u dalších dvou hHA byly srovnatelné.

Při solubilizačních experimentech SRG v hHA bylo zjištěno, že k solubilizaci SRG nedochází, což mohlo být způsobeno nízkou lipofilností domén nebo sterickými vlivy.

Při experimentech s E^α došlo k zákalu vzorků v oblasti koncentrací předpokládaného nasycení micel, který znemožnil měření. Při dalších solubilizačních experimentech s Pe nemohly být proměřena absorbance z důvodu clonění prostředí, i když vzorky a blanky byly čiré. Solubilizační síla byla proto vyhodnocena z emisního měření. Hodnoty solubilizační síly byly stanoveny pro koncentraci $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Pe. Pro derivát s nejvyšším stupněm substituce platí, že při rostoucí iontové síle roste solubilizační síla. Tento vliv iontové síly na rostoucí solubilizační sílu odpovídá vlivu v klasických micelárních systémech. V případě derivátu se středním stupněm substituce je vliv iontové síly opačný. Nejkomplikovanější je to u derivátu s nejnižším stupněm substituce. Solubilizační síla DEC-NH-HA 100/10 byla stanovena na $8,0 \cdot 10^3$ ve vodě, $1,3 \cdot 10^3$ v $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl a $4,5 \cdot 10^3$ v $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl. Solubilizační síla DEC-NH-HA 100/30 byla stanovena na $3,5 \cdot 10^3$ ve vodě, $7,0 \cdot 10^3$ v $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl a $7,5 \cdot 10^3$ v $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl. Solubilizační síla DEC-NH-HA 100/50 byla stanovena na $6,7 \cdot 10^3$ ve vodě, $6,3 \cdot 10^3$ v $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl a $5,6 \cdot 10^3$ v $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl.

Při řešení diplomové práce byly zaznamenány mírné obtíže z důvodu interakcí látek. Obecně platí, že alkylové deriváty HA s vyšším stupněm substituce jsou stabilnější a jejich hydrofóbní domény jsou kompaktnější. Byl prokázán vliv iontové síly na úroveň solubilizace u hHA, avšak nebylo stanoveno obecné pravidlo, kterým by se tento vliv řídil. Každá látka v systému hHA interaguje odlišně, proto každé studium solubilizačních vlastností hHA je specifické a vyžaduje individuální přístup.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Rosen, M. J.: *Surfactants and Interfacial Phenomena*. 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons Inc., 2004. 444 p. ISBN 0-471-47818-0.
- [2] Šíma, J.: *Využití tenzidů v analytické chemii* [online]. [cit.2008-4-3]. Dostupné z: <http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/tenzidy_anal.htm>.
- [3] *Sodium dodecyl sulfate* [online]. [cit. 2008-4-3]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/FLUKA/71725>>.
- [4] *Sodium dodecyl sulfate* [online]. [cit. 2008-4-3]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_dodecyl_sulfate>.
- [5] Bartovská, L., Šišková, M.: *Micela (asociativní)* [online]. [cit. 2008-8-3]. Dostupné z: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/>.
- [6] Bartovská, L., Šišková, M.: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 4. vyd. Praha: VŠCHT, 2002. 192 s. ISBN 80-7080-475-0.
- [7] Bartovská, L., Šišková, M.: *Kritická micelární koncentrace* [online]. [cit. 2008-8-3]. Dostupné z: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/>.
- [8] Hampl, F.: *Biomimetika – organizované vrstvy, liposomy* [online]. [cit. 2008-4-3]. <http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2005/6_Hampl.pdf>.
- [9] Torchilin, V. P. (2006). Polymeric Micelles as Pharmaceutical Carriers. I. F. Uchegbu., & A. G. Schatzlein (Eds.), *Polymers in Drug Delivery* (pp.111-130). CRC.
- [10] *Hyaluronic acid (HA): Background & Biology* [online]. [cit. 2007-12-4]. Dostupné z: <<http://www.trbchemedica.co.uk/pdf/HYALURONIC%20ACID%20background%20&%20biology.pdf>>.
- [11] Hascall, V.C., Laurent, T. C.: *Hyaluronan: Structure and Physical Properties* [online]. 1997, poslední revize 15.12.1997 [cit. 2007-12-4]. Dostupné z: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>.
- [12] *Hyaluronic acid (sodium hyaluronate)* [online]. [cit. 2007-12-4]. Dostupné z: <<http://www.vitamins-supplements.org/carbohydrates/hyaluronic-acid.php>>.
- [13] Mlčochová, P., Bystrický, S., Steiner, B., Machová, E., Kooš, M., Velebný, V., Krčmář, M.: Synthesis and Characterization of New Biodegradable Hyaluronan Alkyl Derivates. *Biopolymers*, 2006, vol. 82, pp. 74-76.
- [14] Pouchlý, J.: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1998. 198 s. ISBN 80-7080-331-2.
- [15] Miguel, M. G., Burrows, H. D., Formosinho, S. J., Lindman, B.: Fluorescence studies of polymer-surfactant association. *Journal of Molecular Structure*, 2001, vol. 563-564, pp. 89-98.
- [16] Sugioka, H., Yoshikiyo, M.: Micelle formation of sodium cholate and solubilization into the micelle. *Biochimica et Biophysica Acta 1394*, 1998, pp. 99-110.
- [17] Kim, J. H., Domach, M. M., Tilton, R. D.: Effect of Electrolytes on the Pyrene Solubilization Capacity of Dodecyl Sulfate Micelles. *Langmuir*, 2000, no. 16, pp. 10037-10043.
- [18] Honda, C., Itagaki, M., Takeda, R., Endo, K.: Solubilization of Pyrene in $C_{12}E_7$ Micelles. *Langmuir*, 2002, no. 18, pp. 1999-2003.
- [19] Bartovská, L., Šišková, M.: *Detergence* [online]. [cit. 2008-4-4]. Dostupné z: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/>.
- [20] Volka, K., a kol.: *Analytická chemie I*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995. 228 s. ISBN 80-7080-245-6.

- [21] *Beer's Law* [online]. [cit. 2008-3-22]. Dostupné z: <http://www.bookrags.com/research/beers-law-woc/>.
- [22] Lambert-Beerův zákon [online]. [2008-3-22]. Dostupné z: <http://projektalfa.ic.cz/LB.htm>.
- [23] *Tocopherol* [online]. [cit. 2008-4-16]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/FLUKA/95240>.
- [24] *Tokoferol* [online]. [cit. 2008-4-16]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Tokoferol>.
- [25] *Sudan Orange G* [online]. [cit. 2008-4-16]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/RIEDEL/65450>.
- [26] *Sudan Red G* [online]. [cit. 2008-4-16]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/FLUKA/17373>.
- [27] *Sudan Red G* [online]. [cit. 2008-4-16]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Sudan_Red_G.
- [28] Fišar, Z. *Principy fluorescenční spektroskopie* [online]. Praha: UK, 2004 [cit. 2008-4-2]. Dostupné z <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>.
- [29] Strasburg, G. M., Ludescher, R. D.: Theory and applications of fluorescence spectroscopy in food research. *Trends in Food Science & Technology*, 1995, no. 3, pp. 69-75.
- [30] Lapčík, L., Pelikán, P., Čeppan, M.: *Fotochemické procesy*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1989. 418 s. ISBN 80-05-00049-9.
- [31] Klán, P.: *Organická fotochemie*. 1. vyd. Brno: MU, 2001. 121 s. ISBN 80-210-2526-3.
- [32] Fišar, Z. *Fluorofory v biomedicíně* [online]. Praha: UK, 2004 [cit. 2008-4-10]. Dostupné z <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>.
- [33] Nile red [online]. [cit. 2008-4-16]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/FLUKA/19123>.
- [34] Mravec, F.: *Fluorescenční spektroskopie ve výzkumu asociativních koloidů*. ver. 2. Brno, 2006.
- [35] *Perylene* [online]. [cit. 2008-4-16]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/FLUKA/77341>.
- [36] *Perylene* [online]. [cit. 2008-4-16]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Perylene>.
- [37] Katoh, R., Sinha, S., Murata, S., Tachiya, M.: Origin of the stabilization energy of perylene excimer as studied by fluorescence and near-IR transient absorption spectroscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 145, 2001, pp. 23-34.
- [38] *Pyrene* [online]. [cit. 2008-4-16]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/FLUKA/82648>.
- [39] Valeur, B.: *Molecular Fluorescence Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001, 381 p. ISBN 3-527-60024-8.
- [40] Aguiar, J., Carpena, P., Molina-Bolívar, J. A., Ruiz, C. C.: On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science* 258, 2003, pp. 116-122.
- [41] Vohlídal, J., Julák, A., Štulík: *Chemické a analytické tabulky*. Praha: Grada, 1999. 652 s. ISBN 80-7169-855-5.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

SDS	dodecylsíran sodný (<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>)
M_r	relativní molekulová hmotnost
t_t	teplota tání [°C]
CMC	kritická micelární koncentrace (<i>Critical Micellar Concentration</i>) [mol L^{-1}]
T_k	Krafftova teplota [K]
CPP	kritický pakovací parametr (<i>Critical Packing Parameter</i>)
HA	kyselina hyaluronová
CAC	kritická asociační koncentrace (<i>Critical Association Concentration</i>)
N_{agg}	agregační číslo
S_c	solubilizační kapacita
S_p	solubilizační síla
ε	molární absorpční koeficient [$\text{mol}^{-1} \text{ m}^2$]
λ	vlnová délka [nm]
A	absorbance
E^α	(\pm)- α - tokoferol
SOG	Sudan Orange G (Sudanová oranž)
SRG	Sudan Red G (Sudanová červeně)
NR	Nilská červeně (<i>Nile Red</i>)
Pe	Perylen (<i>Perylene</i>)
Py	Pyren (<i>Pyrene</i>)
I_F	intenzita fluorescence
ε_r	relativní permitivita
n_D^{20}	index lomu
Δf	orientační polarizovatelnost
hHA	hydrofobizovaný derivát hyaluronanu

8 PŘÍLOHY

Příloha I UV-VIS spektrofotometr, Cary 50 Probe



Příloha II Luminisnenční spektrometr, AMINCO-Bowman, Series 2

